



Etude de la mécanotransduction : relation entre les forces de tractions cellulaires et la dynamique des intégrines.

Richard de Mets

► To cite this version:

Richard de Mets. Etude de la mécanotransduction : relation entre les forces de tractions cellulaires et la dynamique des intégrines.. Physique [physics]. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAY031 . tel-01237682

HAL Id: tel-01237682

<https://theses.hal.science/tel-01237682>

Submitted on 3 Dec 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique pour les sciences du vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Richard DE METS

Thèse dirigée par **le Pr Antoine DELON**
et codirigée par **le Dr Olivier DESTAING**

préparée au sein **Laboratoire Interdisciplinaire de Physique et Institut
Albert Bonniot**
dans **Ecole doctorale de Physique**

Etude de la mécanotransduction : Relation entre les forces de traction cellulaires et la dynamique des intégrines

Thèse soutenue publiquement le **5 Octobre 2015**,
devant le jury composé de :

Mme Catherine Picart

Professeur, Université de Grenoble, Présidente

Mr René-Marc Mège

Professeur, Université Paris/Diderot, Rapporteur

Mr Gregory Giannone

Directeur de recherche, Université de Bordeaux, Rapporteur

Mr Marc Tramier

Ingénieur de recherche, Université de Rennes, Examinateur

Mr Antoine Delon

Professeur, Université de Grenoble, Directeur de thèse

Mr Olivier Destaing

Chargé de recherche, Université de Grenoble, Co-Directeur de thèse

Mr Martial Balland

Maître de conférence, Université de Grenoble, Invité



Remerciements

Trois ans de thèse, cela peut être long, particulièrement quand l'atmosphère de travail n'est pas bonne. Quand l'envie n'y est pas, tout paraît compliqué et il est difficile de fournir des efforts. Les nuits courtes, la frustration de ne jamais voir ses chefs, ses proches, la solitude de n'avoir personne à qui parler. **Forte heureusement, mon environnement de travail a été diamétralement opposé.**

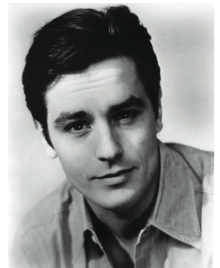
Avant de commencer, j'aimerais remercier les directeurs de l'IAB et du LIPhy (Pierre Hainaut, Jean Louis Barrat, Eric Lacot, Jacques Derouard) pour l'intérêt qu'ils portent à la science et pour avoir permis à de nombreux doctorants comme moi de s'épanouir dans une atmosphère sereine et des laboratoires chaleureux. Merci également à chaque membre de mon jury pour les commentaires et suggestions qui m'ont permis d'améliorer ce manuscrit et de m'améliorer en tant que chercheur.

Je ne remercierai jamais assez mes deux directeurs de thèse Antoine et Olivier pour leur encadrement irréprochable. Je n'aurais pas pu imaginer meilleur soutien et meilleurs chefs que ce duo. Merci beaucoup pour la confiance et la liberté que vous m'avez données. J'aurais aimé poursuivre cette aventure avec vous, et je ne regrette pas d'avoir quitté mon Alsace natale pour vous suivre dans votre projet. Gardez vos expressions sorties de nulle part, vos bretelles et votre moustache, votre folie et votre humanité qui font de vous des encadrants géniaux.



Un remerciement tout particulier également à mon "mentor" durant ces trois années. Merci beaucoup à Martial pour m'avoir protégé et conseillé durant cette thèse. Tu as su être présent à chaque fois que j'ai eu besoin d'une claque pour avancer, et tu as toujours su tirer le meilleur de moi. Tu as fait de moi une meilleure personne, et c'est la larme à l'œil que je tiens à te dire que tu vas me manquer.

Un énorme merci à Irène pour toute l'aide qu'elle m'aura apportée pendant ces trois ans. Sans toi, ma thèse n'aurait pas été la même. Tu as toujours su être présente pour moi, dans et en dehors du laboratoire. Tu es une personne en or, et j'ai eu beaucoup de chance d'avoir pu m'épanouir à tes côtés.



J'aimerais ensuite remercier les personnes de l'équipe et du laboratoire :

Merci à Giovanni pour ton expérience, tes bons conseils et tes blagues d'une grande finesse, Aurélie pour ta bonne humeur et tes bonnes idées, Aurélien pour les discussions, les bons moments passés avec toi, ainsi que ton soutien pendant que j'essayais de participer à Koh-Lanta. Merci à Delphine pour nos échanges à la cafétéria et au confocal pendant ces trois ans, à Lionel pour ta sympathie et pour m'avoir aidé de nombreuses fois sur des questions scientifiques et non scientifiques, à Catherine pour m'avoir écouté et orienté de la meilleure manière possible. (*) en vente dans les meilleures librairies.



(*)

J'aimerais ensuite remercier les doctorants du laboratoire :

A grouped thanks for my office-mates Elisa and Katharina. Thank you for accepting me and my nice rap music in the office. You helped me a lot, and our good conversation was a nice escape for me. I liked a lot the parties we made together and I wish you the best because you deserve it !



Thank you to Cécile, Monika and Joe, from the other office of young people. Even if our office was better, it was nice to share times and drinks with you. Good luck in your life, and I hope you will enjoy your life in the lab as much as I enjoyed mine. I wish you the best.

Merci à Mehdi pour toutes les conversations que nous avons eu en allant à la piscine. Tu m'as permis de conserver un corps de tombeur malgré tous les McDo que je mangeais. Je te souhaite le meilleur pour l'avenir et sois sûr que nos conversations me manqueront.



Un grand merci à Léo pour sa bonne humeur continue pendant ces deux ans au laboratoire. Tes passages nombreux dans le bureau n'étaient jamais dérangeants, et ta sympathie a rendu ces visites plaisantes au final. Je te souhaite le meilleur pour la suite et merci d'avoir toujours été là pour moi.

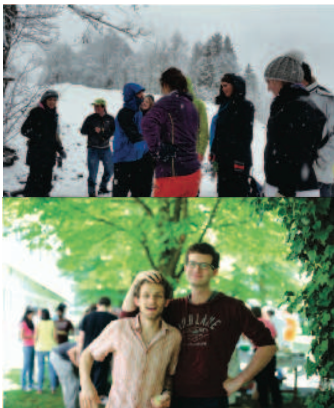
Un merci à Diane pour nos nombreuses discussions qui ont emmené mon esprit dans des terrains inconnus où je n'aurais pas osé m'aventurer tout seul. Bon courage pour ta dernière année et je te souhaite tout le bonheur du monde.





Thanks a lot to Mariana. You helped me a lot to improve my english, and our conversation very helped me to have another look on what I am and what I want. I wish you the best in your life and in your thesis.

A special thank to Adèle and Sacho who helped me a lot to feel home, even in the IAB. It's always hard to find a person in a circular building, and you always helped me by offering me a drink and by telling me to give up to don't waste my time. I enjoyed every drinks we had, and I wish you the best for the future.



I would like to thank all the PhDs/Post-docs, the old ones (Meike, Kalpana, Rachel) and the new ones, and all the interns who came to put fresh air in the lab, but I would like to thank some of them in particular : Charlie, Siddi, Loïc, Ianis, Marie-C and Bernard. You are all very special in a different way, but I enjoyed my time with all of you. I wish you the best, and our beer/indian/rhum/vodka/tequila parties will miss me. Hope I will never see you drunk again =).

Des remerciements à mes amis extérieurs au laboratoire :

Remerciement particulier à tous les joueurs que j'ai côtoyés à Vif et à Sas-senage, ainsi qu'aux coachs qui ont toujours été compréhensifs vis-à-vis de mes absences et retards fréquents aux entraînements.



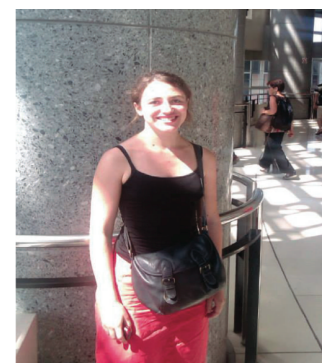
J'aimerais également remercier des personnes que l'on oublie généralement :

Jean-Marc pour son aide précieuse et ses gentilles petites attentions envers les doctorants, Nadine Chantal Annick Jessie pour leur compréhension et leur aide dans toute la paperasse administrative, j'aurais sûrement été perdu sans vous. Le service hygiène et sécurité que j'ai pu côtoyé de très très près et qui m'a énormément aidé.



Enfin un remerciement tout particulier aux personnes qui me sont chères :

Une pensée spéciale à Flore. Je ne sais pas comment faire pour assez te remercier. Ces trois années auraient été beaucoup plus longues sans toi. Tu as pris la peine d'essayer de comprendre ce que je faisais pour me dépanner et m'encourager, et tu m'as été d'une aide inestimable durant ces trois ans. J'espère pouvoir un jour t'être aussi précieux que tu l'as été pour moi.





Merci à Yara pour l'AFM ... Au départ, on s'était fixé des remerciements bateaux, mais je suis incapable de me contenter de te dire merci comme ça. Tu as été une amie proche et indispensable pour moi à Grenoble. Tes rires et ton sourire m'ont toujours suffi à me redonner le moral. Ne change pas. Tu es géniale. Bon courage pour la suite Lololol.



Dans la liste des raisons qui m'ont fait venir à Grenoble, Benoît est en haut de la liste. Merci pour tous les bons moments partagés et les sorties que tu m'as proposées pour me vider l'esprit. Tu as toujours été de bons conseils, et mes années à Grenoble auraient été moins sympa sans toi.



Merci à Philippe pour tout ton soutien pendant ces trois ans. Tu as été d'une aide inestimable. Tes connaissances et nos discussions vont énormément me manquer. Tu as su toujours être présent pour moi, et ton humour et tes blagues me manqueront. Je ne doute pas qu'un jour tes qualités de basketteur seront reconnues, et que je verrai ton nom dans le livre des records. Je te souhaite le meilleur parce que tu es le meilleur !

Un grand merci à Seb alias l'homme des îles pour m'avoir fait m'intéresser à la piscine et m'avoir montré en premier les endroits où traîner dans Grenoble. Tu as été comme un frère pour moi, et ton aide précieuse m'a permis de me sentir chez moi ici. Bonne chance pour la suite !



Merci à Rachel pour toute l'aide que tu m'as apportée pendant ces trois années. Tu as toujours été là quand j'ai eu des doutes, et tu as toujours été de bons conseils. C'est assurément grâce à toi que je suis là aujourd'hui, et je ne te remercierai jamais assez pour ça. Tu sais tout le bien que je pense de toi, et je te souhaite vraiment le meilleur pour la suite.

Even if Teodora was not with me during half of my thesis, she has been the person who helped me the most. You taught me how to handle these three years, and you shared with me your experience to help me to enjoy the most my own thesis. You are one of the best person I know, and you are for sure one of the main reason of my happiness. Multumesc!!!



Finalement je voudrais remercier ma famille pour leur soutien, et particulièrement ma mère. Tu es pour moi un modèle de force et de bravoure. Tu as toujours fait en sorte que mon bonheur passe avant tout, et je ne te remercierai jamais assez pour tout l'amour que tu m'as donné. J'espère te rendre fière et que tu te rends compte que tout ça, c'est grâce à toi.

Table des matières

Remerciement	3
Introduction	1
1 État de l'art	5
1.1 Impact de l'environnement sur le comportement cellulaire . . .	5
1.1.1 Qu'est ce que la mécanosensibilité?	6
1.1.2 De nombreuses réponses cellulaires sont sensibles aux contraintes mécaniques	10
1.2 La génération de force de traction via le complexe acto-myosine	14
1.2.1 La myosine : moteur moléculaire de la contraction cel- lulaire	14
1.2.2 L'actine : support de la transmission des forces de trac- tions dans la cellule	15
1.3 La plaque d'adhérence, zone de contact mécanique entre la cellule et le substrat	20
1.3.1 Le rôle des intégrines	21
1.3.2 Pathologie due à un déficit en intégrine	22
1.3.3 Le cycle d'activation des intégrines	23
1.3.4 Les différents partenaires des intégrines	25
1.3.5 Les différents types de plaques	31
1.3.6 Intégrines et sites adhésifs : Introduction à la coopéra- tion entre $\beta 1$ et $\beta 3$	36
1.3.7 Transmission biochimique de la force sur un système biologique	37
1.4 La microscopie pour la mesure de la dynamique moléculaire .	41
1.4.1 Mesure de mobilité par photoblanchiment	43
1.4.2 Super-résolution et mesure de mobilité par suivi de mo- lécule unique	45
1.4.3 Intérêt des techniques de fluctuation de fluorescence . .	49

2	Objectifs et Stratégie	57
3	Matériel et Méthodes	61
3.1	Microfabrication	61
3.1.1	Protocole pour la conception de motif adhésif sur verre	62
3.1.2	Protocole pour la conception de motif adhésif sur gel .	63
3.2	Technique de mesure de mobilité	65
3.2.1	Par photoblanchiment	65
3.2.2	Par corrélation de fluorescence	67
3.3	Quantification d'images et mesures de forces	76
3.3.1	La microscopie à force de traction (TFM)	76
3.3.2	Quantification de la distribution des adhésions	78
3.4	Biologie cellulaire et manipulation	80
3.4.1	Culture cellulaire	80
3.4.2	Tri cellulaire	81
3.4.3	Congélation	83
3.4.4	Immunomarquage	83
4	Résultats expérimentaux	85
4.1	Géométrie pour contrôler la distribution des forces	85
4.1.1	Modulation du niveau de contraintes sur un motif en flèche sur gel	89
4.1.2	Distribution des acteurs de l'acto-adhésion	92
4.2	Lien entre tension et mobilité des intégrines	95
4.2.1	Le RICS ne nous permet pas d'étudier la dynamique des intégrines	95
4.2.2	$\beta 1$ -GFP ne change pas sa mobilité en réponses aux contraintes mécaniques	98
4.2.3	$\beta 3$ -GFP module sa mobilité en réponses aux contraintes mécaniques	100
4.2.4	Les mesures de FRAP confirment une variation de mo- bilité de $\beta 3$ -GFP en réponse à la tension	103
4.3	Base moléculaire de la mécanosensibilité	105
4.3.1	Le domaine cytoplasmique est responsable du compor- tement des intégrines	105
4.3.2	La phosphorylation du site de la taline et kindline es- sentielle pour la régulation de la dynamique des intégrines	108
4.3.3	SFK, régulateur de la mobilité de $\beta 3$?	116
5	Conclusion et perspectives	119

Bibliographie	I
Annexe	XIV
Protocole	XIV
Table des figures	XXIX
Liste des tableaux	XXXI

Introduction

La capacité des cellules à s'attacher à un substrat est un processus très important dans le développement d'un organisme. De la formation d'un tissu au moment de l'embryogenèse, à l'imperméabilisation d'un tissu ainsi que la migration cellulaire, tous ces processus dynamiques se basent essentiellement sur la capacité des cellules à interagir avec leur environnement et à adhérer plus ou moins fortement avec des protéines composantes du milieu intercellulaire, la matrice extracellulaire.

La matrice extra-cellulaire joue un rôle complexe dans l'établissement du comportement de la cellule. Elle oriente à la fois sa prolifération et sa migration, ainsi que sa forme et sa survie. L'adhérence de la cellule à la matrice initie une réaction en chaîne, allant des protéines membranaires permettant l'adhérence, jusqu'au noyau grâce au cytosquelette. Une fois le contact créé, la cellule sera alors capable d'exercer plus ou moins de forces sur son substrat pour en connaître les propriétés mécaniques. Cette capacité à transformer l'information sur les propriétés mécaniques de l'environnement en signal biochimique est appelée la mécanotransduction cellulaire. On parle de réaction bidirectionnelle, puisque les cellules sont capables de sécréter et remodeler la matrice extracellulaire, modifiant ainsi les propriétés mécaniques de l'environnement, qui va alors moduler l'homéostasie tensionnelle des cellules.

Cette connexion entre le milieu extracellulaire et le noyau grâce au cytosquelette d'actine rend ainsi les cellules capables de toucher, sentir, réagir différemment selon le milieu dans lequel elles se trouvent. Cela peut se traduire par une augmentation de la force de traction, en favorisant leur migration

dans une direction lors de la cicatrisation ou de la réponse immunitaire, ou par exemple en orientant les processus de différenciation cellulaire en fonction de la rigidité du tissu dans lequel les cellules se trouvent.

La mécanotransduction est donc un processus dynamique, en particulier grâce à la capacité de la cellule à modifier en temps réel les points d’ancrage au substrat. C’est le réarrangement des protéines impliquées dans l’adhérence qui permet à la cellule de modifier son comportement. Pour comprendre comment la cellule réagit aux contraintes mécaniques, il est donc important d’étudier la dynamique des molécules jouant un rôle dans la mécanotransduction.

La question de la dynamique de ces molécules est devenue un sujet émergent crucial pour la compréhension de la mécanotransduction[63]. Il est à présent établi que les modulations des forces internes et externes sont gouvernées, à l’échelle moléculaire, par de larges variations des interactions protéiques. Par exemple, il a été démontré que des protéines tel que la zyxine, une protéine mécanosensible impliquée dans la création du contact entre la cellule et le substrat a une dynamique différente en fonction de la rigidité du substrat [85], ou alors que deux intégrines différentes, protéines connues pour avoir un rôle complémentaire dans l’établissement des forces de tractions, ont une dynamique distincte l’une par rapport à l’autre[116]. Pour comprendre ces processus, il faut disposer d’outils capables de sonder, à l’intérieur d’une cellule vivante, la dynamique et les interactions de biomolécules : leur état d’agrégation, leur mode de transport.

Ce travail de thèse s’inscrit donc dans la volonté d’élucider les caractéristiques dynamiques des molécules responsables de la mécanotransduction et leur lien avec les forces de traction exercées. L’introduction vise à donner les bases bibliographiques des connaissances dans ce domaine, ainsi que le contexte de travail exposé par la suite : les propriétés mécaniques de l’environnement ont un effet sur la cellule (partie 1.1). Elles modifient la manière dont les cellules s’étalent et se déplacent sur le substrat, ainsi que les forces de tractions que les cellules appliquent. Deux groupes de protéines en interac-

tion sont impliquées dans ce mécanisme, le complexe acto-myosine contractile (partie 1.2) et les adhérences cellulaires composées d'intégrines (partie 1.3). C'est le couplage et le remaniement de ces deux entités qui permet à la cellule de s'adapter à son environnement. Ces modifications de comportement sont faites de manière dynamique, et nous avons à notre disposition plusieurs outils pour étudier la concentration et la dynamique de ces protéines mécanosensibles (partie 1.4).

Chapitre 1

État de l'art

1.1 Impact de l'environnement sur le comportement cellulaire

Chez les organismes pluricellulaires, l'organisation des cellules en tissus suppose une grande coopération fonctionnelle et une unité structurale. Les tissus sont composés à la fois d'une partie cellulaire et d'une partie de matrice extra-cellulaire (et a-cellulaire) qui assure leurs cohésions. La proportion de cellule par rapport à la matrice définit le rôle et les propriétés mécaniques du tissu (Figure 1.1).

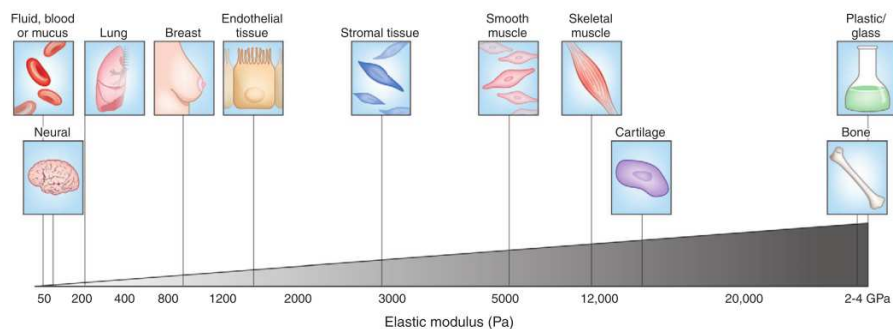


FIGURE 1.1: **Schéma représentant les différentes rigidités tissulaires du corps humain**[31]. Les différentes rigidités des tissus humains s'étendent sur une large gamme allant de quelques Pa pour le cerveau à plusieurs GPa pour les os.

L'importante activité contractile des muscles est corrélée avec un tissu comprenant une forte fraction cellulaire et une faible fraction en matrice extra-cellulaire. En comparaison, le tendon a une fraction de matrice beaucoup plus importante, conférant au tissu une rigidité apparente plus importante. La capacité des cellules à interagir entre elles a donc un effet sur les propriétés mécaniques du tissu. Elles peuvent également interagir avec leur environnement et s'associer au substrat via des adhérences extra-cellulaires. Ces zones de contacts sont appelées des adhérences focales, permettant le lien entre le cytosquelette d'acto-myosine à l'intérieur de la cellule et la matrice extra-cellulaire. Les adhérences focales sont de véritables sites de génération et d'intégration de forces qui s'exercent sur la cellule. Elles servent de plateforme de relais des tensions intra- et extra-cellulaire vers des voies de signalisation spécifiques, susceptibles de modifier la composition et le comportement des adhérences et donc de la cellule. Elles agissent comme des récepteurs d'élasticité et de densité de matrice extra-cellulaire[51, 72], susceptibles de modifier le devenir de la cellule. Ce mécanisme est appelé la mécanosensibilité cellulaire.

1.1.1 Qu'est ce que la mécanosensibilité ?

Les cellules peuvent exercer des forces sur leur substrat, et les moduler pour leur permettre de se mouvoir, grâce à des voies de signalisation intracellulaires. Les cellules sont cependant aussi capables de réagir au type d'environnement dans lequel elles sont exposées. En incubant des cellules sur un substrat mou avec un gradient de rigidité, les cellules ont tendance à migrer dans la direction la plus rigide du substrat[88](Figure 1.2). Ce comportement est appelé "durotaxis". Il est la preuve que la cellule est capable de sonder les propriétés mécaniques de son environnement, et de modifier dynamiquement la composition et la position de ces adhérences pour migrer dans une direction préférentielle, la plus rigide.

Les propriétés mécaniques de l'environnement ont plusieurs effets importants sur l'étalement des cellules. Sur substrat dur, la connexion entre la

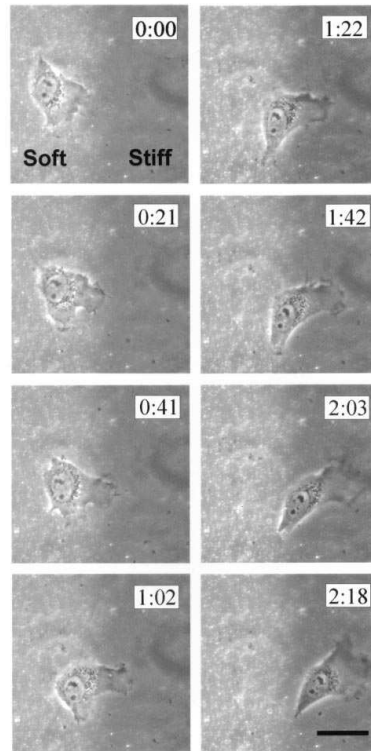


FIGURE 1.2: **Les cellules migrent préférentiellement vers les régions rigides du substrat**[88]. En disposant des cellules 3T3 sur un gel de poly-acrylamide avec un gradient de rigidité (mou sur la partie claire, dur sur la partie foncé), les cellules migrent préférentiellement vers la partie rigide du substrat, barre d'échelle $40\mu\text{m}$

matrice extra-cellulaire et le cytosquelette est plus forte que sur substrat mou[140]. En augmentant la rigidité du substrat, on augmente généralement la surface d'adhérence des cellules, ainsi que la force de traction que la cellule applique sur son substrat[42]. Les cellules auront donc toujours tendance à se déplacer vers les régions les plus dures. L'estimation des forces de traction que la cellule applique sur le substrat peut se faire en disposant des cellules sur des piliers de PDMS¹ et en observant le déplacement des piliers. Grâce à cela, il est également possible de jouer sur deux paramètres mécaniques importants, la rigidité du matériel utilisée et la rigidité apparente du substrat, en jouant sur les caractéristiques du pilier, tel que sa hauteur et son

1. PolyDiMethylSiloxane

rayon[132]. Il est donc possible de décorréler les réponses locale et globale à la rigidité en utilisant avec un même matériel deux tailles de pilier différentes résultant en deux rigidités apparentes différentes. Ce résultat nous montre que l'intégration de l'information sur les propriétés mécaniques se fait localement au niveau des adhérences focales, mais que la cellule réagit de manière globale via son cytosquelette d'actine (Figure 1.3).

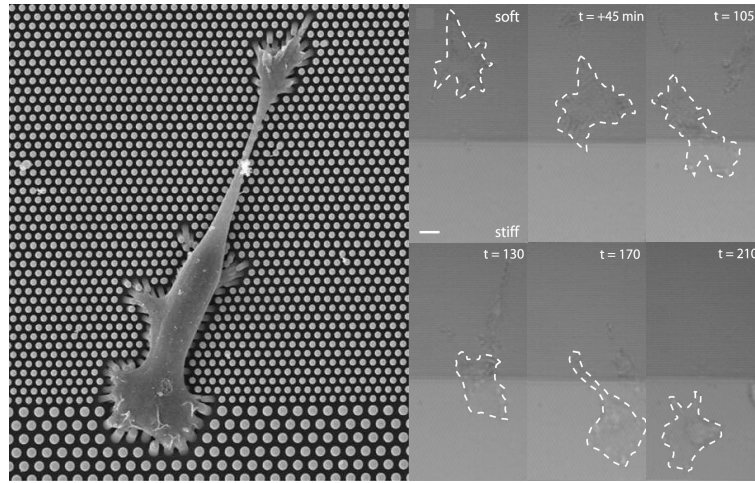


FIGURE 1.3: Les cellules sont sensibles à la rigidité apparente du matériau[132] En faisant adhérer une cellule sur un substrat composé de deux type de pilier de PDMS, des piliers de petits diamètre (partie sombre sur les images de droites), correspondant à une rigidité apparente petite comparé aux piliers de grands diamètres (partie claire sur les images de droite), les cellules migrent préférentiellement vers la région contenant des piliers de grands diamètres, malgré que la rigidité du matériau soit la même pour les deux piliers. Barre d'échelle = $10\mu\text{m}$

La mécanosensibilité est une caractéristique des adhérences focales, structure transmettant les forces du cytosquelette au substrat. Elles jouent un rôle primordial de part leur contact avec le milieu extérieur, tandis que leur taille et leur mobilité sont modulées par les propriétés mécaniques du substrat[7, 11]. Elles sont cependant également sensibles à d'autres types de protéines, tel que la concentration en matrice extra-cellulaire[57, 64, 131].

Les cellules sont en contact direct avec cette matrice. Un changement dans la composition de la matrice induit donc une variation de comporte-

ment des adhérences focales [99]. A faible concentration en protéines de la matrice extra-cellulaire, la cellule n'est pas en mesure de s'accrocher, et elle meurt d'apoptose (appelé aussi anoïkis). En augmentant la quantité de fibronectine, protéine composante de la matrice extra-cellulaire, le nombre de sites d'accrochage est augmenté, permettant à la cellule de migrer plus facilement, jusqu'à atteindre un plateau de vitesse[57] (Figure 1.4). En saturant la surface en matrice, la migration cellulaire est ralentie. Une explication vient du fait que l'augmentation de la concentration en protéines de la matrice augmente également la quantité de plaques d'adhérences, empêchant ainsi la cellule de se mouvoir de manière optimale de part son nombre de points d'ancrage trop important.

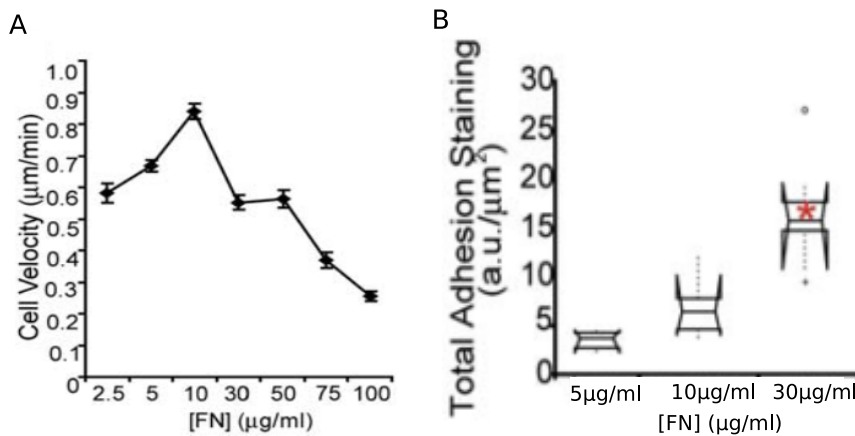


FIGURE 1.4: L'augmentation de concentration en matrice extra-cellulaire augmente puis ralentit la migration cellulaire[57] A. Courbe représentant la vitesse de migration de la cellule en fonction de la concentration en matrice. Plus la concentration augmente, moins la cellule migre rapidement. B. Intensité par immunomarquage des adhérences cellulaires. En augmentant la concentration en matrice, la cellule augmente également son nombre d'adhérence, et diminue donc sa vitesse de migration. Une explication vient du fait que l'augmentation du nombre de plaques d'adhérence bloque la cellule et l'empêche de se déplacer de manière optimale.

Il apparaît donc que l'espacement entre les différentes molécules de fibronectine, c'est-à-dire sa densité, est un paramètre important pour connaître la réponse mécanique de la cellule. Il est en effet possible de moduler, à rigi-

dité constante, la vitesse de migration des cellules en jouant sur l'espacement entre différentes molécules de fibronectine[27].

Ceci montre l'impact des propriétés nanométriques de l'environnement sur l'étalement et la migration cellulaire.

1.1.2 De nombreuses réponses cellulaires sont sensibles aux contraintes mécaniques

La migration mésenchymateuse

Les cellules sont capables de sentir les propriétés mécaniques du substrat, et de répondre à ce qu'elles sentent en migrant dans une direction déterminée en exerçant plus de forces. Cette capacité est importante dans de nombreuses étapes de la vie cellulaire, lui permettant de réagir aux contraintes imposées par l'environnement. Elles permettent en exerçant des forces de traction de maintenir l'intégrité d'un tissu, ou de favoriser la migration pour la cicatrisation en cas de blessure.

La dynamique d'assemblage et désassemblage des adhérences focales est importante pour la cicatrisation[60, 71]. Lors d'une blessure, en inhibant les récepteurs de la fibronectine avec des anticorps, les cellules continuent de se diviser, mais la migration n'est pas dirigée, et la plaie cicatrise mal. De même, en incorporant un inhibiteur de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine dans le milieu, principale composante des adhérences focales sur fibronectine, la plaie a tendance à s'élargir plutôt que se refermer, indiquant le rôle essentiel des intégrines pour la migration cellulaire et la cicatrisation(Figure 1.5).

La différenciation cellulaire

Les propriétés mécaniques de l'environnement extra-cellulaire ont donc un impact majeur sur le comportement des cellules, tel que l'étalement, la migration[88], mais aussi sur la différenciation[131]. Il s'agit de la capacité d'une cellule multipotente, tel que les cellules souches présentes dans les premières étapes de l'embryogenèse, à adapter l'expression de programmes gé-

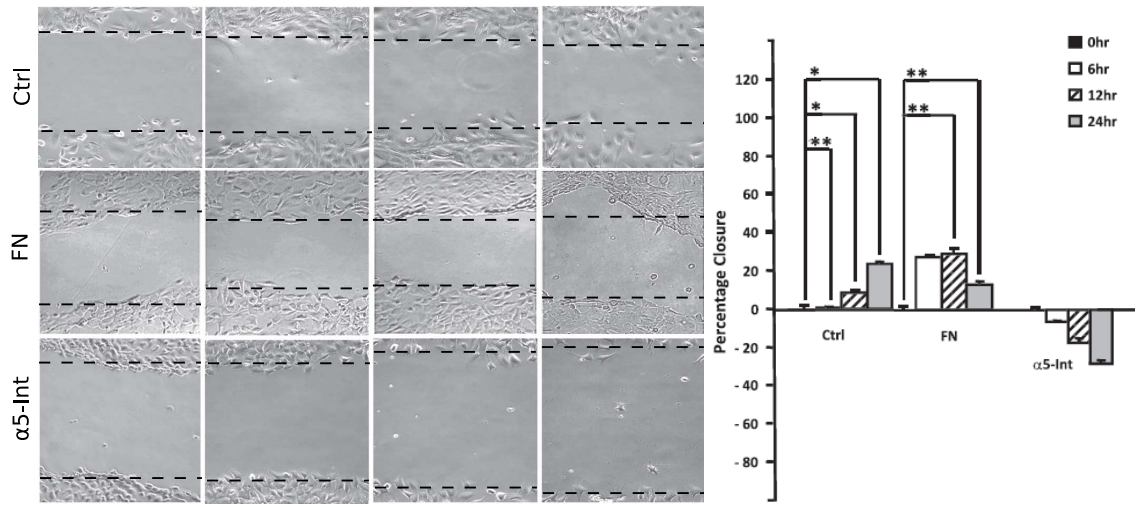


FIGURE 1.5: **La perturbation de l'adhérence au substrat à un effet négatif sur la cicatrisation**[71]. En absence de fibronectine, ou en inhibant l'intégrine $\alpha 5$, la cicatrisation est perturbée et n'est plus optimale montrant l'importance des adhérences cellulaires et de leur modulation dans la cicatrisation

nétiqes la conduisant vers l'acquisition de certaines propriétés et marqueurs spécifique d'un tissu.

La liaison entre la membrane plasmique et la matrice extra-cellulaire via les intégrines et l'actine montre le rôle central de la mécanotransduction dans la différenciation cellulaire [110, 138](Figure 1.6).

En effet, la capacité des cellules à sentir les propriétés mécaniques du substrat permet d'orienter la différenciation des cellules souches[46]. En incubant des cellules souches sur des substrats avec des rigidités différentes, il est possible d'orienter la différenciation cellulaire : en neurones sur substrats mous ($\sim 0,2\text{kPa}$), en cellules musculaires sur substrats plus rigides ($\sim 10\text{kPa}$), en os sur substrats encore plus rigides ($\sim 40\text{kPa}$). En faisant la même expérience en présence de blebbistatin, une drogue inhibant la contraction cellulaire, les cellules sont donc incapables d'exercer des forces sur le substrat pour sonder leur environnement, et on n'observe plus de différenciation, démontrant le rôle central de la mécanotransduction dans la différenciation cellulaire (Figure 1.7).

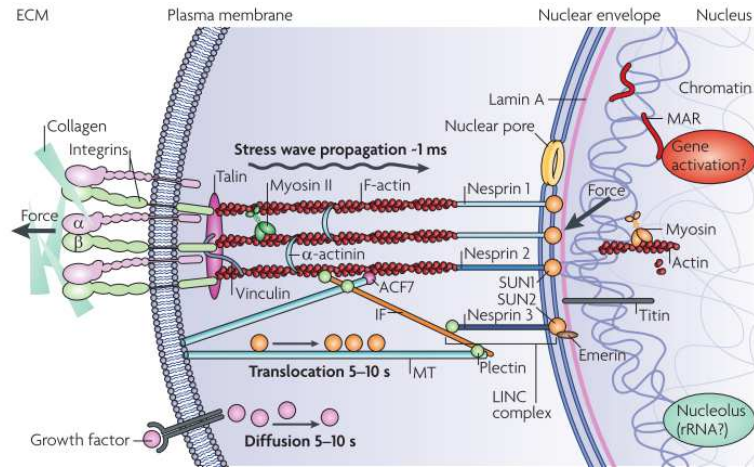


FIGURE 1.6: **Effet des propriétés mécaniques sur l'expression génique.**[138] Illustration des différents acteurs responsables de la connexion entre le milieu extra-cellulaire et le noyau.

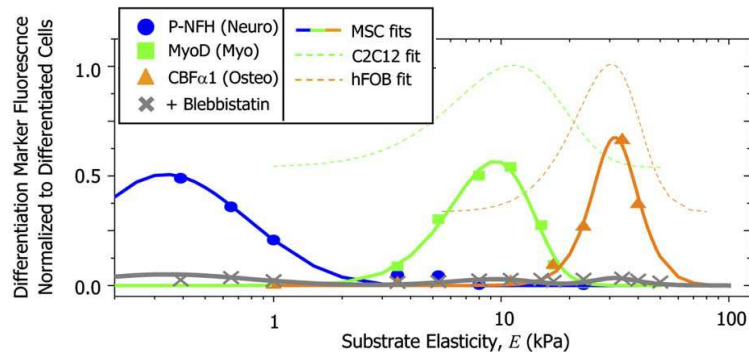


FIGURE 1.7: **Il est possible d'orienter la différenciation cellulaire en jouant sur la rigidité du substrat.**[46]. Les courbes représentent les taux de transformation en fonction de la rigidité du substrat. Les cellules souches ont tendance à se transformer en neurones, muscles ou os en fonction de la rigidité du substrat. La même expérience en présence de blebbistatin ne montre aucune différenciation, illustrant que la capacité des cellules à exercer des forces sur le substrat est essentielle pour la mécanotransduction cellulaire.

Cependant, il est intéressant de noter qu'il est possible d'inverser la différenciation en cas de pathologie[102]. Dans la vie courante, il est possible de détecter des tumeurs par simple palpation, car les tissus cancéreux sont connus pour avoir une rigidité plus importante que les tissus les environnants. En incubant des cellules différenciées dans un milieu plus rigide que leur mi-

lieu naturel, on peut observer la sur-activation de voies de signalisation tel que la voie ERK, mimant ainsi certaines étapes du développement tumoral. En limitant la contractilité de ces cellules, il est possible cependant de baisser l'activation de ERK, et ainsi de rétablir un phénotype sain aux cellules. La contractilité étant liée à la rigidité du substrat, cette baisse de contractilité revient à mimer un substrat de rigidité moins important se rapprochant des conditions non-pathologiques. La génération et la régulation des forces de traction sont donc des paramètres importants dans la différenciation cellulaire, la survie des cellules et le développement tumoral[102].

Dans la prochaine partie, nous verrons les principaux acteurs de la réponse cellulaire aux contraintes mécaniques, de la génération des forces par l'interaction entre la myosine et le cytosquelette d'actine jusqu'à leur transmission au substrat via les adhérences focales.

1.2 La génération de force de traction via le complexe acto-myosine

1.2.1 La myosine : moteur moléculaire de la contraction cellulaire

Les myosines sont une large famille de protéines. Grâce à un inhibiteur spécifique (la blebbistatine), la plus étudiée dans le milieu de la mécanotransduction cellulaire est la myosine-II. Elle est responsable de la contraction cellulaire dans les tissus musculaires (forte concentration) et non musculaires (faible concentration). Elle est composée de deux chaînes légères capables de se lier à d'autres chaînes légères pour former un filament et de deux chaînes lourdes aussi appelées "têtes de myosine", capables d'interagir avec l'actine (Figure 1.8). En se liant à une molécule d'ATP², la tête de la myosine se détache de la fibre d'actine. L'hydrolyse de l'ATP en ADP³ a pour effet de déformer la tête de la myosine vers une extrémité de la fibre d'actine. La tête de myosine, toujours liée à l'ADP devient alors activée, et fortement attirée par les sites de liaison situés sur les molécules d'actines. Pendant cette phase d'accrochage, la tête de la myosine se replie sur elle-même, conduisant à une contraction de la fibre, générant une force moyenne de 3-4pN par myosine[49]. Pendant cette phase, la molécule d'ADP est libérée et laisse la place libre pour une nouvelle molécule d'ATP. La blebbistatine est une drogue ayant pour effet de bloquer la tête de la myosine dans une conformation ayant une faible affinité pour l'actine, empêchant ainsi la contraction[80]. La blebbistatine a ainsi par exemple permis d'identifier que la capacité des cellules à exercer des forces de traction était importante dans le processus de mécanotransduction[46].

2. Adénosine Triphosphate

3. Adénosine Diphosphate

1.2.2 L'actine : support de la transmission des forces de tractions dans la cellule

Le cytosquelette d'actine est l'infrastructure permettant de transmettre l'énergie produite par la myosine à la cellule et d'exercer des forces de traction sur le substrat. Le cytosquelette d'actine est l'élément du cytosquelette le plus fin ($\sim 7\text{nm}$ de diamètre) devant les filaments intermédiaires et les microtubules, faisant de lui l'élément le plus souple. Ils sont constitués de monomères d'actine globulaire (actin-G). Lorsque ces monomères polymérisent, ils forment des filaments appelés actin-F en forme d'hélices de pas 37nm . La première étape de formation de l'actine-F s'appelle la nucléation.

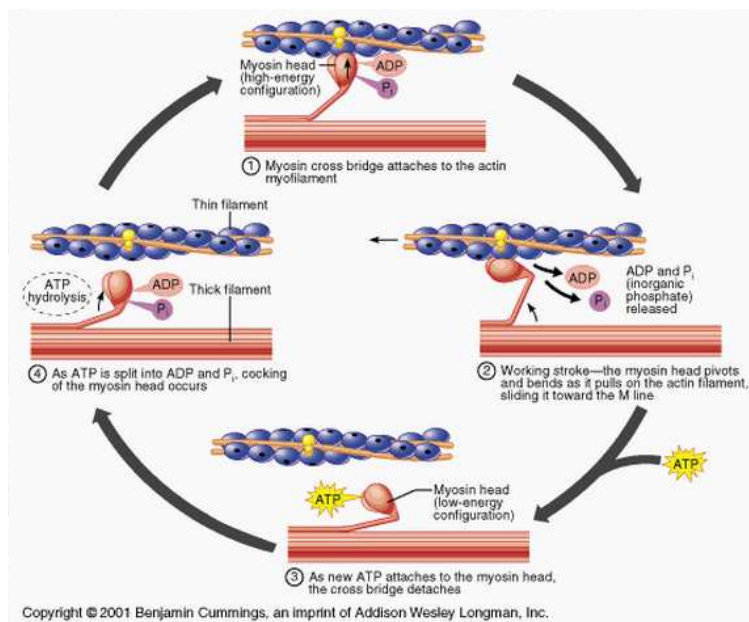


FIGURE 1.8: **Étapes de la contraction d'une fibre d'actine par la myosine.** 1. La myosine couplée à une molécule d'ADP se lie avec l'actine. 2. La libération de l'ADP conduit à une déformation de la tête de la myosine et un déplacement de la fibre d'actine, générant une force moyenne de $3\text{--}4\text{pN}$ par myosine[49]. 3. La tête de myosine pourra ainsi se lier à une molécule d'ATP, et ainsi détacher la myosine de l'actine. 4. L'hydrolyse de l'ATP en ADP conduit à une déformation de la tête de myosine, et augmente l'affinité de la myosine pour l'actine. Image extraite depuis le site <http://legacy.owensboro.kctcs.edu/>

In vitro, il a été vu que deux puis trois monomères d'actine-G s'assemblent. Ce trimère sert de nucléateur pour les étapes suivantes de la polymérisation. La polymérisation de l'actine se fait de manière polarisée. C'est à dire que la polymérisation se fait à une extrémité appelée pôle + (ou bout barbé) grâce à des agents nucléateurs de la famille des formines tel que mDia, et se dépolymérise au niveau du pôle - (ou bout pointu) par l'action de la cofiline par exemple.

Un autre type de nucléation peut se produire sur un filament d'actine déjà existant. Il s'agit du branchement des fibres, qui permet de couvrir une surface plus importante à partir du tronc principal. Ce branchement est possible grâce à l'interaction entre le complexe Arp2/3 avec l'actine, Arp2/3 servant ainsi de nouveau point de polymérisation de l'actine formant un angle constant de 70° par rapport au filament existant (Figure 1.9).

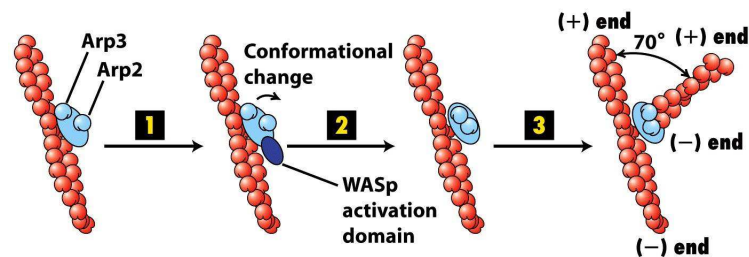


FIGURE 1.9: **Branchage de l'actine à 70° grâce au complexe Arp2/3.** L'interaction entre le complexe Arp2/3 et la fibre d'actine conduit au branchement de la fibre avec un angle de 70° , image extraite du livre "Molecular Cell Biology", 6ème édition(2008)

Dans une cellule en migration, le complexe Arp2/3 s'active principalement au niveau du front d'avancée de la cellule, formant une structure branchée modifiant la forme globale de la cellule. Il existe plusieurs types de superstructures de l'actine permettant de modifier la forme de la cellule.

L'actine corticale

L'actine corticale est un gel d'actine présent dès les premières étapes de l'étalement cellulaire. Elle permet de tendre la membrane plasmique. En fonction du type cellulaire, différents réticulants sont impliqués, mais leur rôle est toujours le même : ancrer le cortex d'actine à la membrane et permettre aux cellules d'adhérer au substrat (Figure 1.10).

Les filopodes

Les filopodes sont les deuxièmes structures visibles après étalement. Il s'agit de longues baguettes d'actine-F rigides permettant à la cellule d'explorer localement l'environnement (Figure 1.10). Les filaments formés ont la particularité d'être arrangés de manière parallèle et très compacte, bloquant la liaison de la myosine II avec l'actine, empêchant ainsi la fibre de se contracter et d'exercer des forces[13].

Les lamellipodes

Le lamellipode est la principale structure permettant l'avancée de la cellule une fois adhérente sous la forme d'un fin film cytoplasmique. Il est constitué d'un réseau branché et entrelacé d'actine formant un gel quasi-2D[13]. Ce réseau aura comme fonction de pousser la membrane plasmique en polymérisant l'actine contre elle et en recrutant un grand nombre de complexes Arp2/3 formant donc un réseau très dense d'actine non contractile associé à la lamelle qui est contractile (Figure 1.10).

Les fibres de stress

Ces fibres sont visibles à la toute fin de l'étalement cellulaire. Elles peuvent se contracter et exercer des forces entre les deux points d'ancrage la liant au substrat. Un cross-linker va permettre aux filaments d'actine de se former dans les cellules non musculaires en se liant entre deux filaments d'actine. L' α -actinine par exemple est suffisamment grande pour que la myosine II

puisse s'insérer entre deux filaments antiparallèles pour former le complexe acto-myosine qui pourra alors se contracter[111].

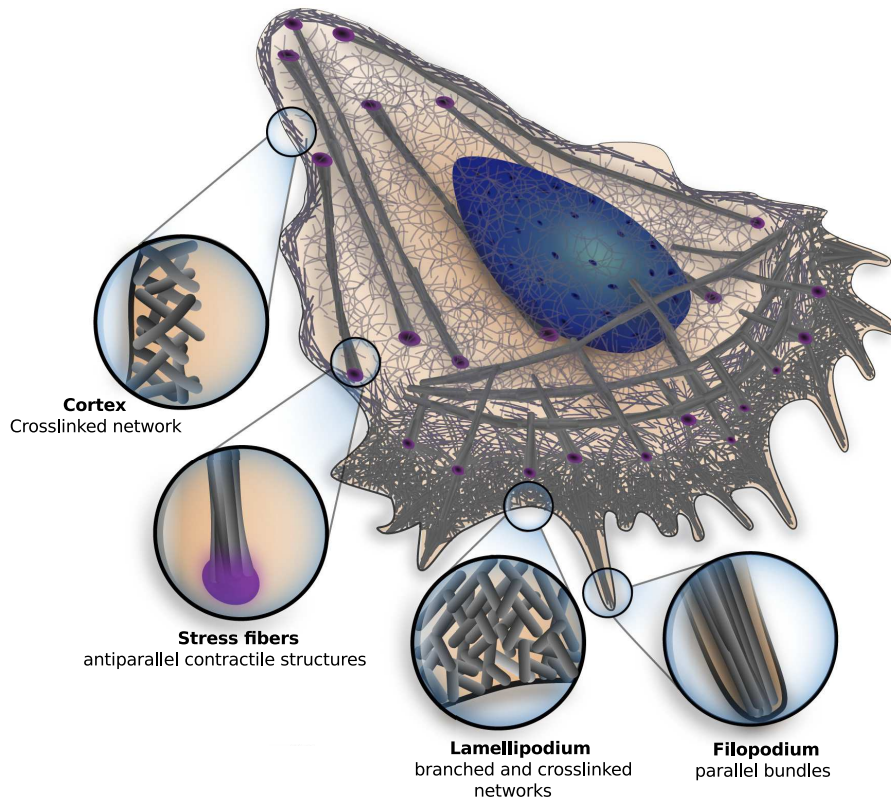


FIGURE 1.10: **Les super-structures de l'actine une fois la cellule adhérente au substrat**[13]. Le cortex et le lamellipode sont constitués d'un réseau d'actine formant un gel. Les filopodes sont constitués de fibres d'actine parallèles, les fibres de stress de fibres d'actine antiparallèle contractiles. Les adhérences sont représentées en violet

C'est la formation et la régulation des fibres de stress qui permet à la cellule de se mouvoir. Cette régulation est principalement prise en charge par des Rho-GTPases, une famille de protéines actives sous leur forme GTP⁴, et inactives lorsque le GTP est hydrolysé en GDP⁵. Cette famille de protéines est composée en particulier de Rho, Rac et Cdc42, ayant à la fois des rôles complémentaires et opposés.

4. Guanine triphosphate

5. Guanine diphosphate

Rho régule la formation de fibres de stress acto-myosique contractile, et joue un rôle dans la contraction et la rétraction, notamment à l'arrière de la cellule migrante.

Rac et Cdc42 quant à elles sont localisées à l'avant de la cellule migrante où Rac régule la polymérisation de l'actine et permettant la formation de lamellipodes, tandis que Cdc42 régule la formation de filopodes, mais également la polarisation de la cellule et la direction de sa migration[107]. Rho et Rac sont des protéines antagonistes, car elles forment des gradients d'activité opposées entre l'arrière et l'avant de la cellule.

Ces différentes structures présentées ci-dessus définissent la forme de la cellule. Il est intéressant de noter que l'actine permet également, pour des types cellulaires particuliers, d'initier une migration cellulaire rapide et avec une faible interaction avec les protéines du substrat, aussi appelée migration amiboïde. Certaines études tentent de créer un lien entre les différents types d'extension[34], et d'établir une chronologie[43]. Pour certains types cellulaires, il apparaît que l'étalement se fait de manière isotrope dans les premières minutes avec une croissance homogène du lamellipode, puis la cellule aura tendance à se polariser (anisotropie d'étalement) via une augmentation du flux rétrograde d'actine dans une partie du lamellipode[44]. L'actine permet pour la majorité des types cellulaires d'exercer des forces sur le substrat. Elles sont transmises au substrat via un ensemble de protéines regroupées sous forme de structures servant à faire le lien entre le cytosquelette d'actine et la matrice extra-cellulaire : les adhérences cellulaires.

1.3 La plaque d'adhérence, zone de contact mécanique entre la cellule et le substrat

Ces forces générées par le cytosquelette d'acto-myosine sont ensuite transmises à l'environnement via des récepteurs membranaires. Dans le cas des tissus, les forces peuvent être transmises entre les cellules via des récepteurs tel que les cadhérines[23]. Dans cette thèse, nous avons plutôt étudié des cellules uniques adhérant sur une couche de matrice extra-cellulaires. Les récepteurs membranaires mises en jeu dans ce cas précis sont les intégrines.

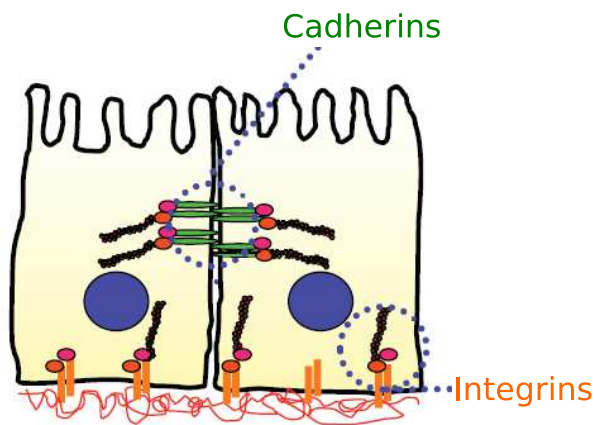


FIGURE 1.11: **Les récepteurs membranaires transmettant les forces**[23]. Les cellules peuvent transmettre les forces générées par le cytosquelette d'acto-myosine à l'environnement via les cadhérines formant des jonctions cellule/cellule ou les intégrines formant des adhérences focales avec la matrice extracellulaire.

Les intégrines servent à la mise en place d'une continuité mécanique entre le cytosquelette d'acto-myosine interne et les polymères de la matrice extracellulaire. Elles ont tendance à s'agréger pour former des structures appelées adhérences focales.

Lors de la migration, la cellule va créer des adhérences stables qu'elle peut remanier[100]. La capacité d'une cellule à adhérer à un substrat est un processus essentiel pour la survie de la cellule. Les protéines capables de créer ce lien sont essentiellement les intégrines. Ils existent cependant différents types

d'adhérence focale ayant chacun une forme, une dynamique et une composition protéique différente permettant à la cellule de réagir aux propriétés mécaniques de son environnement. Dans des cas pathologiques, les cellules vont pouvoir envahir un tissu en mettant en place un type d'adhérence particulier appelé invadosome[1, 87, 123]. Tous ces différents types de structures sont possibles grâce aux remaniements dynamiques du cytosquelette d'actine et des intégrines[57].

1.3.1 Le rôle des intégrines

Les intégrines sont des hétérodimères transmembranaires composés d'une chaîne α et d'une chaîne β longue d'environ 800 acides aminés, 700 acides aminés sont à l'extérieur de la cellule, et environ 100 acides aminés forment le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique[84]. Chaque hétérodimère (24 couples fonctionnels possibles à ce jour) a une affinité spécifique pour une certaine protéine de la matrice extracellulaire, lui conférant ainsi une fonction particulière. Par exemple, le complexe $\alpha 5 \beta 1$ est capable de lier le tripeptide RGD de la fibronectine exclusivement, alors que $\alpha v \beta 3$ aura la capacité de lier à la fois la vitronectine et la fibronectine[9] (Figure 1.12). Cette redondance illustre une relation de coopération entre les intégrines sur un substrat donné.

Le bras extérieur de l'intégrine est très long (15nm) pour faciliter l'ancrage à la matrice extracellulaire. Une fois l'intégrine engagée, elle a tendance à s'agréger, formant des structures appelées dans un premier temps complexes d'adhérences, avant de mûrir sous l'action des forces émises par le complexe acto-myosine et former des adhérences focales stables[26, 101] (Figure 1.13). Les 24 couples d'intégrines ont, malgré la redondance de leur composition, des spécificités propres à chacune de part leur affinité avec la matrice extracellulaire ou avec les différents partenaires cytosoliques, illustrant l'aspect coopératif de leurs actions. Malgré la faible affinité entre les intégrines et leur matrice extra-cellulaire, leur concentration élevée à la surface est suffisante pour obtenir un système fonctionnel et efficace[145].

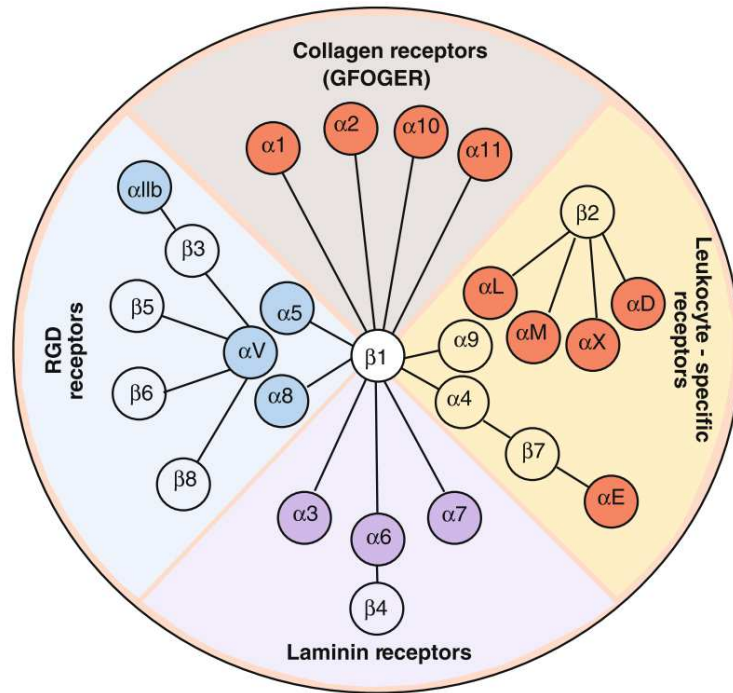


FIGURE 1.12: **Famille des intégrines et leurs ligands extracellulaires**[9]. La redondance et la particularité de chaque couple d'intégrines suggèrent l'aspect coopératif de leurs actions.

1.3.2 Pathologie due à un déficit en intégrine

Bien que les 24 hétérodimères d'intégrines identifiés chez les mammifères soient relativement redondantes dans leur lien avec les substrats extracellulaires, ils conduisent à des voies de signalisations spécifiques. L'arrivée de techniques biologiques de ciblage de gène par recombinaison homologe (Knock-out) ont permis de générer des souris auxquelles ils manquent spécifiquement une intégrine ciblée. Ces modifications constituent un modèle indispensable pour comprendre et étudier les maladies génétiques, ainsi que pour explorer la fonction de ces protéines *in vivo*. Les phénotypes létaux à des stades embryonnaires ou périnataux sont répertoriés figure 1.14.

La suppression de l'expression des gènes codant pour les intégrines conduit à des phénotypes variés, allant de la mortalité précoce jusqu'à des souris à l'apparence normale. Les phénotypes non létaux sont répertoriés dans le ta-

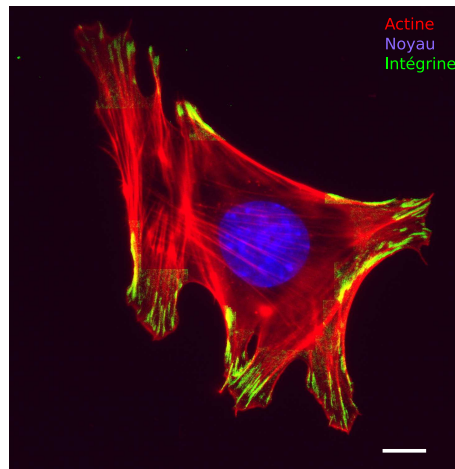


FIGURE 1.13: **Immunomarquage de cellule MEF sur verre couvert de fibronectine.** Les MEF sur fibronectine ont tendance à s'étaler et former des structures riches en intégrines appelées plaque d'adhérence. Ces plaques d'adhérence font le lien entre la matrice extra-cellulaire et le cytosquelette d'actine. Les fibres d'actines tirées au travers la cellule (rouge) lui permettent de moduler sa forme et de générer des forces de traction pour se mouvoir.

bleau 1.1.

1.3.3 Le cycle d'activation des intégrines

L'intégrine est une protéine diffusant librement dans la membrane. Elle possède une conformation native dite repliée. La partie extracellulaire de l'intégrine est alors incapable de se lier à la matrice, sa partie liante étant non exposée.

L'engagement de l'intégrine a pour effet de modifier sa mobilité. Elle passe d'un régime de diffusion libre en 2D dans la membrane plasmique à une immobilisation de part son interaction à ces deux extrémités. Pour se désengager, l'intégrine peut interagir avec d'autres protéines dites inhibitrice qui viendront se lier sur les mêmes sites que les activateurs (NxxY proximal pour la taline et NxxY distal pour la kindline)[84]. Cette régulation se fait en partie via la phosphorylation de l'intégrine par des kinases tel que FAK, SFK, ou Syk[55]. Les protéines inhibitrices peuvent varier en fonction des

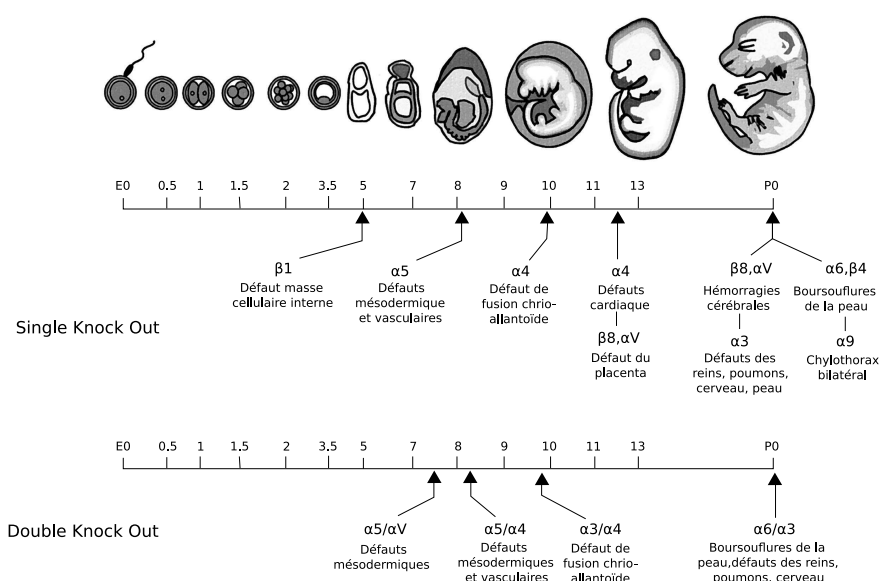


FIGURE 1.14: Les pathologies létales dû à un déficit en intégrine au cours de l'embryogénèse.[15] Les différentes pathologies induites pas un déficit en intégrine sont indiquées sur l'échelle des temps. Des phénomènes tel que par exemple les hémorragies peuvent être assimilé à un défaut de maintien de l'intégrité d'un tissu dû par exemple à un problème de contractilité tissulaire.

intégrines. Par exemple ICAP1 réduit l'activation de l'intégrine $\beta 1$ et Dok1 réduit l'activation de l'intégrine $\beta 3$ [3, 55, 98].

Il existe deux voies d'activation des intégrines permettant de changer sa conformation (Figure 1.16). La voie dite "inside-out" consiste à faire interagir l'intégrine inactive avec des partenaires cytoplasmique pour modifier sa conformation dans sa partie extra-cellulaire et de modifier son affinité pour la matrice. Les protéines activatrices connues sont les talines 1,2[22, 56, 124] et les kindlines 1,2,3[81, 124]. La taline étant capable de lier également l'actine, elle permet à elle seule à créer un continuum entre le cytosquelette d'actomyosine et la matrice extra-cellulaire. L'autre voie d'activation possible des intégrines est la voie outside-in et correspond à une interaction entre la matrice et l'intégrine qui va avoir pour effet de briser le pont salin entre les deux bras cytoplasmique des sous-unités α et β et d'augmenter l'affinité de l'intégrine pour la taline et la kindline.

Gène	Phénotype
$\alpha 1$	Angiogenèse tumorale réduite
$\alpha 2$	Agrégation plaquettaire, adhérence sur Collagène retardées
$\alpha 7$	Dystrophie musculaire
$\alpha 8$	Reins réduits ou absents, défauts des oreilles internes
$\alpha 10$	Pas de phénotype apparent
αL	Défaut de recrutement des leucocytes, rejet tumoral
αM	Défaut de phagocytose et d'apoptose, obésité
αE	Lésions inflammatoires de la peau
αIIb	Défauts d'agrégation plaquettaire
$\beta 2$	Défaut de recrutement des leucocytes, infection de la peau
$\beta 3$	Défauts d'agrégation plaquettaire, ostéopétrose
$\beta 5$	Pas de phénotype apparent
$\beta 6$	Inflammation de la peau et des poumons, fibrose des poumons
$\beta 7$	Plaques de Peyer anormales, réduction des lymphocytes intra-épithéliaux

TABLE 1.1: **Phénotype in vivo des souris déficientes en intégrines**[15]. Des défauts de contractilités peuvent être identifié dans le cas par exemple de l'absence de l'intégrine $\alpha 7$ pour lequel la contraction musculaire est impossible.

L'activité des intégrines ne se résume donc pas uniquement à être capable de se lier à la matrice extracellulaire et au cytosquelette en même temps, mais c'est cette capacité à modifier sa dynamique et d'osciller entre un état de faible et de forte affinité avec la matrice extra-cellulaire qui définit l'activité et la fonctionnalité des intégrines dans le processus de mécanotransduction. C'est pourquoi l'analyse du cycle d'activation des intégrines et donc d'un mesure globale de leur dynamique prends toute son importance.

1.3.4 Les différents partenaires des intégrines

Cette étape d'ouverture est primordiale pour l'établissement du pont moléculaire entre la matrice extra-cellulaire et les fibres d'actines. Après s'être liée avec la taline, l'intégrine est capable dans sa partie extra-cellulaire de se

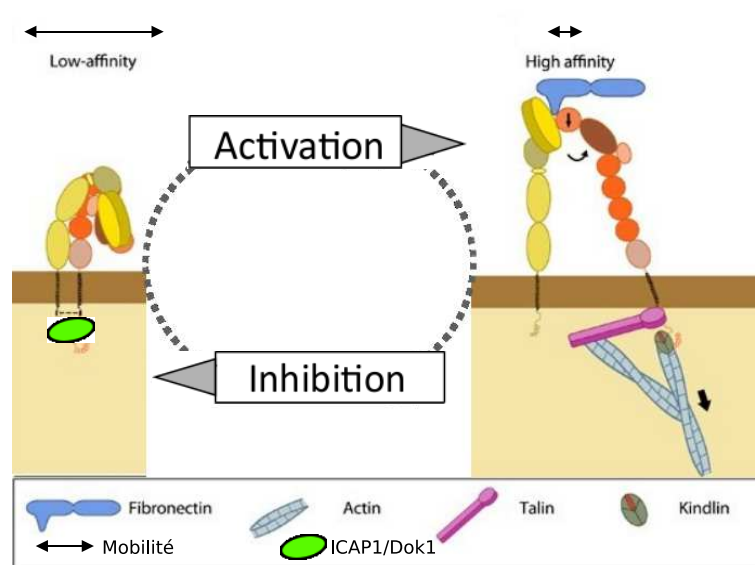


FIGURE 1.15: **Cycle d'activation/inhibition des intégrines.** La fonction des intégrines est d'osciller entre un état de faible et forte affinité pour la matrice extracellulaire, modifiant sa dynamique. Cette dynamique est régulée par l'interaction avec des protéines activatrices (taline, kindline) ou inhibitrice (Dok1, ICAP1), adapté depuis mechanibio.info

lier à la matrice. La taline cytoplasmique peut lier l'actine, ou d'autres protéines adaptatrices tel que l' α -actinine, elles mêmes capables d'interagir avec d'autres protéines telles que la zyxine, ou la vinculine, recrutant à leur tour la paxilline, ou la tensine formant un complexe moléculaire impliqué dans le processus de "molecular clutch" ou embrayage moléculaire[26, 59, 147]. C'est la connexion entre ce complexe moléculaire connecté aux intégrines et le cytosquelette d'actine qui permet de transmettre des forces au substrat[26, 104].

Les talines sont une famille de protéines particulière et essentiel dans l'établissement des adhérences focales. Elles ont un rôle central dans l'activation des intégrines et possèdent un domaine de liaison à l'actine permettant à elle seule d'établir un lien l'intégrine et le cytosquelette d'actine[32]. Son inhibition se traduit logiquement par une altération des adhérences focales dans les cellules épithéliales[2], dans les fibroblastes[96], ou lors de l'embryogenèse[19, 149] et leur conséquence est aussi délétère que l'absence d'intégrine elle-même. Nous verrons plus tard en quoi la taline est une pro-

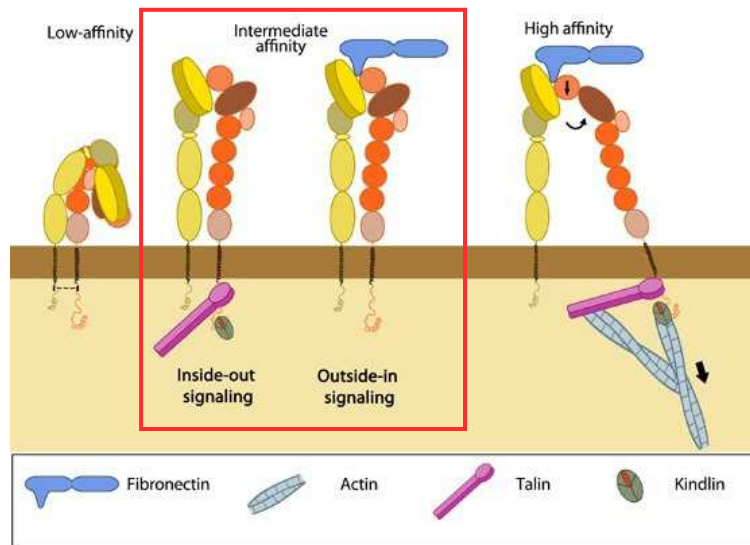


FIGURE 1.16: **Les différentes voies d'activation des intégrines.** Les intégrines peuvent être activées par deux voies différentes appelées inside-out ou outside-in ayant comme effet de changer l'affinité de l'intégrine pour la matrice extracellulaire et de la lier mécaniquement au cytosquelette d'actine, adapté depuis mechanibio.info

téine mécanosensible intéressante à étudier pour comprendre la mécanotransduction.

Les kindlines sont l'autre famille de protéines régulant l'interaction cellule-matrice. La kindline-2 participe à l'activation des intégrines et est aussi un partenaire des catenines important dans l'établissement des jonctions cellule-cellule[70, 91]. Elle possède un domaine FERM3 important pour la liaison avec la queue cytoplasmique de la sous-unité β de l'intégrine[91]. Elle est capable de lier à la fois $\beta 1$ et $\beta 3$ [81], avec une affinité plus forte pour $\beta 1$ [94] et est essentielle pour la formation et la stabilisation des adhérences focales[61].

Il a été montré que sous l'action des forces, les adhérences focales montraient un recrutement important de protéines structurales tel que la vinculine, mais également en kinases et en protéines phosphorylées telles que la phospho-paxilline[101, 55].

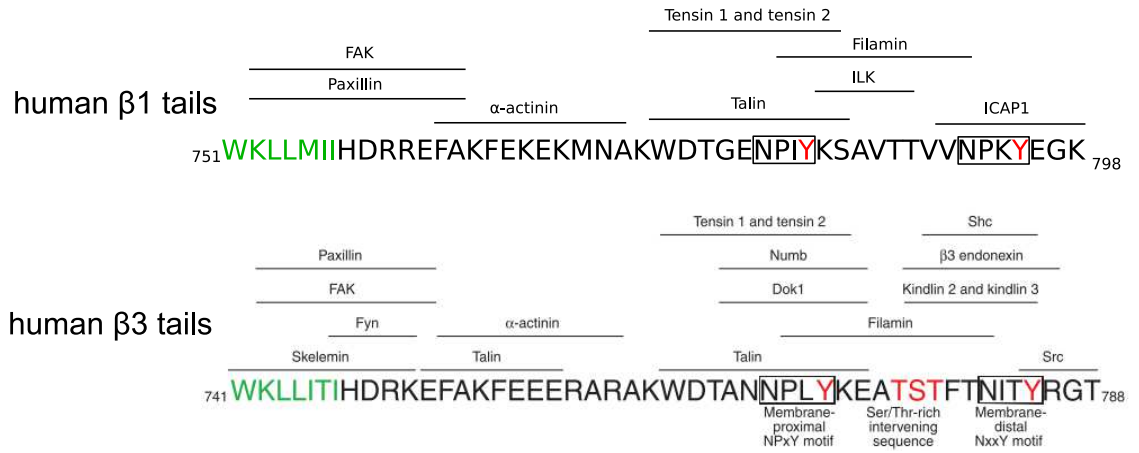


FIGURE 1.17: **Les différents partenaires des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$.** Les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ possèdent quel modification dans leur chaîne d'acide aminé conduisant à des interactions avec des protéines adaptatrices différentes et des rôles différents. Cette figure est basée sur les travaux de Legate[84] et modifiée pour faire apparaître les différents interactants de $\beta 1$ identifiés par Dedhar[36].

La vinculine recrutée a pour rôle de stabiliser le lien entre l'actine et la taline, permettant à la cellule d'exercer localement plus de force[45, 66]. La vinculine constitue donc un très bon marqueur de tension, indiquant à quels endroits les adhérences focales sont sous tension (Figure 1.18).

La paxilline est une protéine hautement phosphorylable de 68-70kDa qui se localise aussi dans les adhérences focales. Elle a un rôle dans la transmission de signal et dans le recrutement de fibres d'actine et d'autres protéines adaptatrices[26, 120]. Elle est également responsable du désassemblage des complexes focaux et est fortement présente dans les invadosomes dégradant la matrice extra-cellulaire dans le cas de cellules cancéreuses. La phosphorylation de la paxilline sur sa tyrosine-118 est un événement important pour la maturation des plaques focales et leur connexion au cytosquelette d'actine[20, 95, 101]. Cette phosphorylation se traduit par un recrutement de la vinculine[53, 101] et une augmentation du temps de résidence de la paxilline et a donc tendance à stabiliser l'adhérence focale entière[106]. Observer le niveau de phosphorylation de la paxilline permet d'avoir une indication

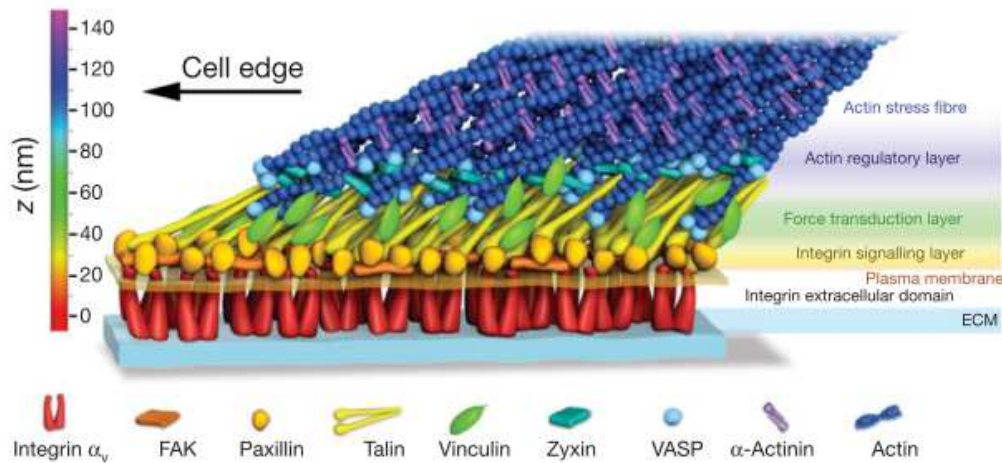


FIGURE 1.18: **Organisation en couches des protéines mécanosensibles dans les adhérences cellulaires**[69]. Schéma illustrant les différentes protéines sensibles aux propriétés mécaniques du substrat jouant un rôle dans l'adhérence cellulaire

sur le niveau de maturation et de tension dans une plaque d'adhérence et ainsi sur sa stabilité.

La phosphorylation des protéines sur les tyrosines et les sérines se font par les kinases. La protéine FAK (Focal Adhesion Kinase) est une kinase importante responsable de la phosphorylation de la paxilline [55]. A ce jour, FAK et SFK sont les grandes classes de tyrosine-kinases impliquées dans la mécanorégulation. Elles vont agir en coordonnant de multiples composants des sites adhésifs. Nous nous sommes focalisés sur les SFK dans la mécanotransduction. Les protéines de la famille de Src (SFK⁶ sont des tyrosines-kinases particulières capables de se lier avec l'intégrine $\beta 3$ uniquement[5]. Elles sont connues pour être responsables de la phosphorylation de la paxilline et de l'activation de la vinculine [55] ainsi que la formation des invadosomes, structures adhésives particulières par lesquelles la cellule cancéreuse est capable de digérer la matrice extracellulaire pour aller infecter un tissu voisin[38]. Dans une cellule saine, Src est connue pour phosphoryler les sites NxxY distaux

6. Src family kinase

et proximaux de l'intégrine et ainsi modifier les propriétés de liaison entre l'intégrine et son ligand, en induisant par exemple un changement d'affinité. Pour le site de liaison de la taline, activateur d'intégrine, la phosphorylation du site de liaison induit un changement d'affinité favorisant l'accroche de Dok1, inhibiteur des intégrines $\beta 3$, se traduisant par un désengagement de l'intégrine avec ses activateurs, un repliement puis sa rupture de liaison avec la matrice extra-cellulaire[98].

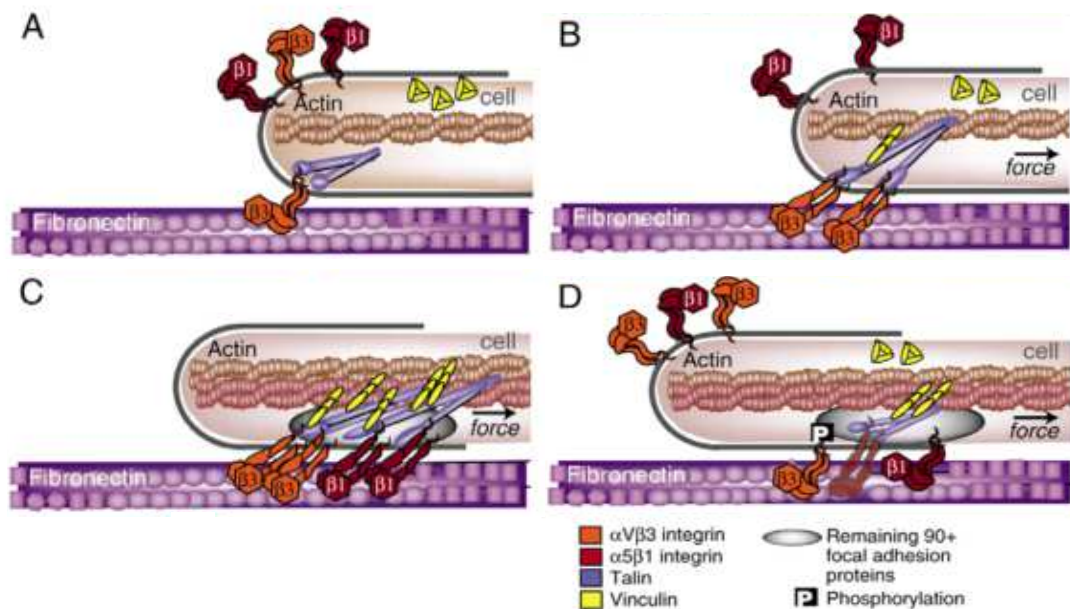


FIGURE 1.19: Le cycle d'activation des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ [105]. A. Établissement d'un contact entre la cellule et le substrat grâce aux protusions B. Les intégrines lient le cytosquelette d'acto-myosine et commencent à transmettre des forces au substrat. C. La plaque mature sous l'effet des forces et recrute d'autres protéines mécanosensibles. La cellule avance sur le substrat grâce aux forces de tractions. D. La phosphorylation des adhérences focales et le recyclage des intégrines permet le désassemblage de l'adhérence à l'arrière de la protusion, et la création d'une nouvelle adhérence à l'avant de la cellule.

1.3.5 Les différents types de plaques

Les adhérences focales sont connectées à la fois à la matrice extra-cellulaire et au cytosquelette d'actine, auquel la myosine confère une forte contractilité. Il a d'abord été établi qu'il était possible de faire le lien entre la taille des adhérences, et leur niveau de tension[7]. Il a ensuite été démontré que cette extrapolation n'était pas possible[11, 77, 121], mais que l'on pouvait classer les adhérences en fonction de leur composition protéique.

Au cours des différentes phases de l'étalement, la cellule met en place différents types de plaques ayant des compositions protéiques variées permettant à la cellule de répondre à toutes les étapes nécessaires pour adhérer au substrat. Nous pouvons distinguer différentes classes d'adhérences en fonction de leurs formes, leurs périodes d'apparitions et de leurs compositions protéiques, certaines protéines étant spécifiques à un type d'adhérence particulière. Les adhérences focales sont décomposables en trois couches distinctes composées de protéines typiques[26, 69, 53], la couche composée par les intégrines (ISL : Integrin Signaling Layer) d'épaisseur 30nm environ, la couche des protéines adaptatrices (FTL : Force Transduction Layer) composée des protéines tel que la taline ou la vinculine situées au-dessus de la couche ISL (30-60nm), puis la couche des protéines structurales (ARL : Actin Regulatory Layer) composée de protéines telles que l'actine et l' α -actinine (Figure 1.20). Il est ensuite possible d'étudier la localisation des protéines dans ces différentes couches pour classer les adhérences.

Les complexes focaux

Les premières adhérences visibles au moment de l'étalement cellulaire sont appelées les complexes focaux, formes maturées des adhérences naissantes ayant la même composition, mais étant plus larges et plus stables. Elles ont une forme plutôt arrondies, et sont généralement situées à la périphérie de la cellule. Leurs surfaces ne dépassent pas $1\mu\text{m}^2$ [68]. Elles contiennent des protéines adaptatrices, reliant l'intégrine au cytosquelette (Taline, Vinculine, Paxilline, couche ISL puis FTL figure 1.20 proche de l'intégrine), mais sont

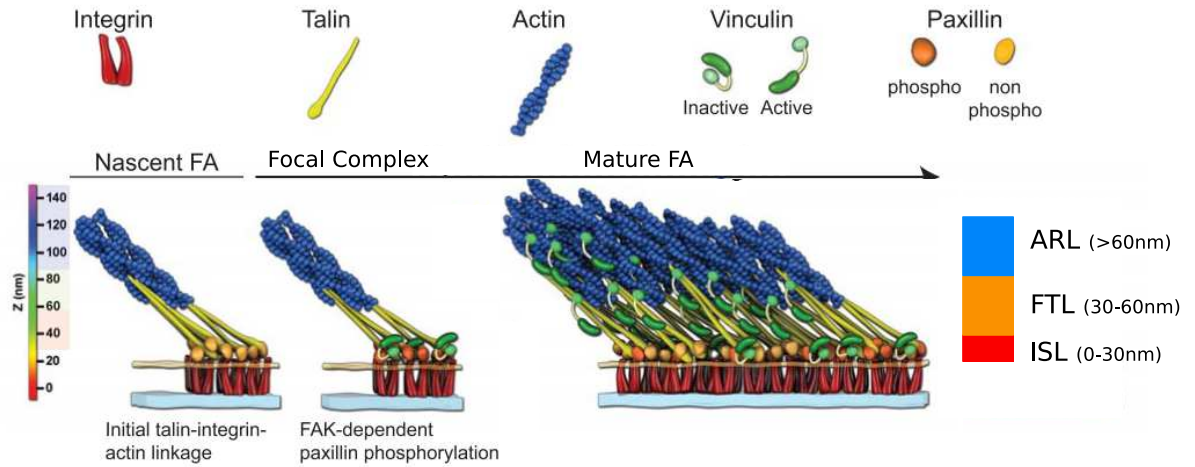


FIGURE 1.20: **Maturation des complexes focaux sous l'action des forces.** Illustration des changements de composition protéique au cours de la maturation des adhérences régité par la myosine II. Schéma adapté depuis Case & al[26]. ISL : Integrin signaling layer, FTL : Force transduction layer , ARL : Actin regulatory layer

dépourvues de protéines structurales (α -actinine, couche ARL du côté de l'actine).

Les complexes focaux sont le siège d'un important remodelage du cytosquelette d'actine, de part leurs interactions avec FAK, capable de recruter Arp2/3, protéine permettant le branchement de l'actine, recrutant à son tour d'autres facteurs de nucléation de l'actine, ou de phosphoryler la paxilline dans les complexes focaux qui aura pour effet de recruter la vinculine et maturer le complexe focal en adhérence focale (Figure 1.21).

Les complexes focaux, ou adhérences focales peu denses, ne semblent donc pas être des structures contractiles, mais servent plutôt à l'étalement rapide de la membrane cellulaire. Ils ont un temps de vie moins importants que les adhérences focales, avec un taux de recyclage plus important[140]. Ils peuvent ensuite se développer en adhérence focale grâce à l'activation de RhoA[112], ou se recycler sous l'action de protéine de la famille des kinases tel que SFK⁷ ou FAK [101, 139] qui participent ainsi à la fois à la formation,

7. Src family kinase

à la maturation et au désassemblage du complexe focal.

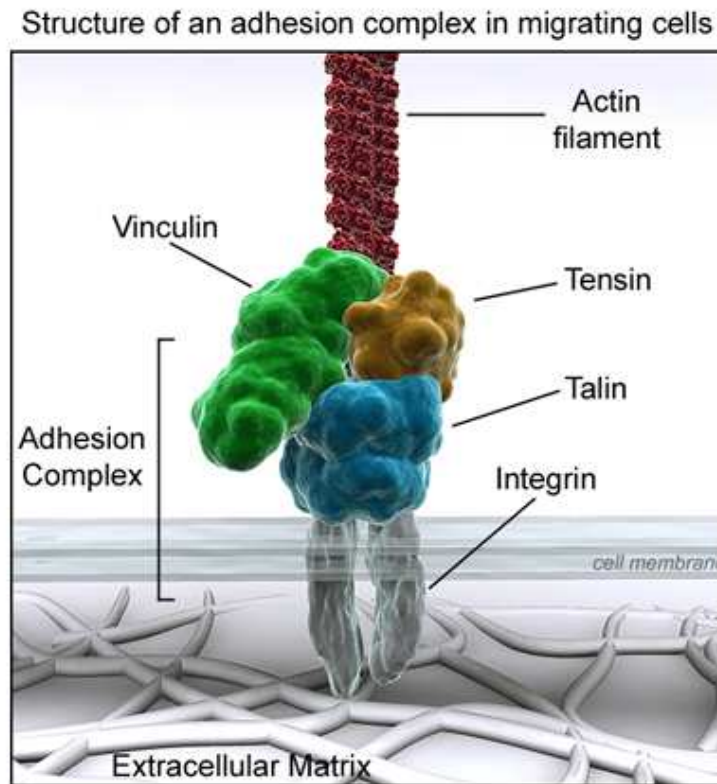


FIGURE 1.21: **Composition d'un complexe focal.** Illustration des différentes protéines composants les complexes focaux, forme maturée intermédiaire des adhérences naissantes, image extraite du site <http://www.reading.ac.uk/nitricoxide>

Les adhérences fibrillaires

Les adhérences fibrillaires sont visibles avec des fibroblastes en culture étalés sur une matrice de fibronectine. Elles sont fines et ont un aspect allongé ou ponctué dû à l'exercice de forces de traction sur ces adhérences. La particularité de ces adhérences est qu'elles ne sont pas concentrées à la périphérie de la cellule, mais en position centrale. Elles tirent leur nom de leur interaction forte avec les fibrilles de fibronectine. Ces adhérences ont une composition moléculaire particulière, riche en tensine, faible en paxilline

avec une forte concentration en intégrine $\beta 1$ [73, 148]. Le dépôt de fibronectine exerce un effet de régulation sur la mise en place des adhérences fibrillaires, puisqu'elles sont absentes sur tout autre type de matrice[126]. Les adhérences fibrillaires illustrent la capacité des structures adhésives à avoir un effet sur l'organisation de la matrice extra-cellulaire, mettant en avant l'aspect bidirectionnel du processus de mécanotransduction[147].

Les adhérences focales

Les structures d'adhérences les mieux caractérisées sont les adhérences focales. Elles ont une forme allongées, une taille plus importante que les complexes focaux et sont très denses en intégrine (Figure 1.22). On connaît aujourd'hui près de 300 protéines associées aux adhérences focales[1, 147]. Des études biochimiques ont mis en évidence un réseau complexe d'interaction protéine-protéine, protéine-enzyme, protéine-kinase ajoutant encore de la complexité, ainsi qu'un aspect dynamique à l'adhérence cellulaire.

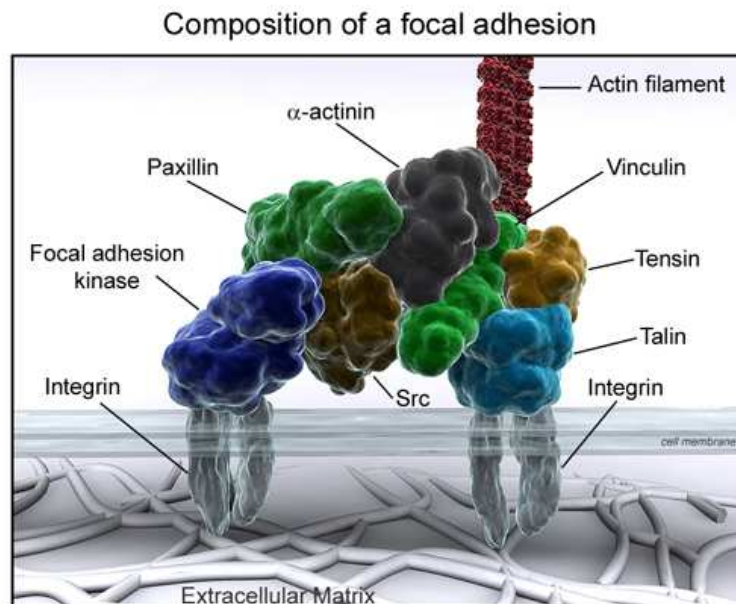


FIGURE 1.22: **Composition d'une adhérence focale.** Illustration des différentes protéines présentes dans les adhérences focales, image extraite du site <http://www.reading.ac.uk/nitricoxide>

Transmettre des forces sur le substrat est la fonction majeure des adhérences focales. Elles constituent des sites d'intégration et de transduction mécaniques des forces. Elles transmettent les variations de tensions intra et extra-cellulaire vers des voies de signalisation modifiant ainsi la composition et le comportement des adhérences. Les adhérences focales sont très fortement connectées au cytosquelette d'actine puisque les fibres de stress s'y ancrent. L'inhibition de la myosine II par l'utilisation de blebbistatine induit une chute de la contractilité via la destruction des fibres de stress ainsi que des adhérences focales[30]. En terme de composition, les adhérences focales sont des structures riches en intégrine $\beta 3$ et $\beta 1$ comparées aux complexes focaux sur fibronectine.

Les adhérences focales sont connues pour avoir une dynamique moins importante que les complexes focaux. On remarque cependant une différence de mobilité globale de la plaque entre les plaques à l'avant et à l'arrière d'une cellule en migration, l'adhérence focale étant quasi-statique à l'avant et ayant un mouvement de glissement vers le centre de la cellule à l'arrière[140](Figure 1.23).

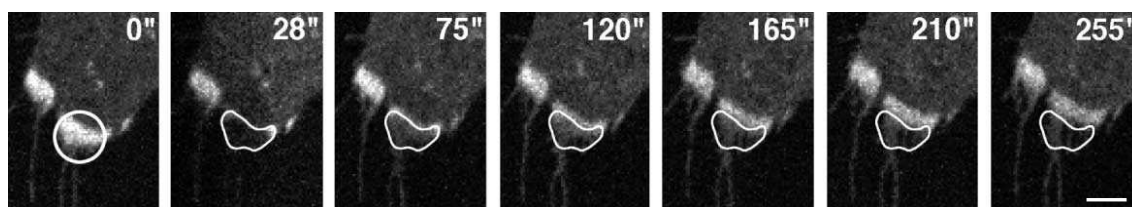


FIGURE 1.23: **Glissement d'une plaque arrière $\beta 3$ -GFP vu par FRAP.**[140] Le photoblanchiment d'une plaque arrière permet de voir un phénomène de glissement de la plaque focale au cours du temps. Cela vient du fait que la plaque focale observée est une plaque située à l'arrière de la cellule, donc sous faible tension. Elle aura donc tendance à se désassembler et glisser sur le substrat, barre d'échelle = $5\mu\text{m}$.

Puisque l'activation de RhoA est nécessaire à la maturation des complexes focaux en adhérences focales, leur désassemblage est géré par l'inactivation de RhoA. Cette inactivation peut se faire par l'intermédiaire de protéines appelées GAP (GTPase Activation Protéines) qui stimule l'activité GTPa-

sique de ces protéines, conduisant à l'hydrolyse d'un GTP en GDP et une conformation inactive de ces protéines. La suppression de RhoA a comme effet la perte de contractilité des fibres d'acto-myosine et stimule le désassemblage des adhérences focales[28]. Le désassemblage des adhérences focales est également contrôlé via les kinases de la famille de Src, qui régulent l'inactivation de RhoA[6, 48]. La protéine FAK semble également importante, du fait que les cellules ne produisant pas FAK possèdent des adhérences focales anormalement grandes[67] et que la sur-expression induit une augmentation de la migration cellulaire[25].

Bien que l'étalement et la contractilité dépendent grandement du cytosquelette d'acto-myosine, il semblerait que les microtubules aient également un rôle à jouer dans ces processus. Le réseau de microtubule servant de "réseau autoroutier" pour le transport de vésicules dans toute la cellule, une perturbation de ce réseau induit donc un impact sur la dynamique des points d'ancrage. Des études ont mis en avant qu'une désorganisation du réseau de microtubules dans les fibroblastes conduit à un renforcement des fibres de stress et des adhérences focales[12, 47]. Une hypothèse plausible attribue aux microtubules un rôle dans la livraison ou la suppression de molécules régulatrices affectant la contractilité via des moteurs moléculaires, les kinésines[75], démontrant le rôle central des microtubules dans la polarisation de la cellule[74] et l'importance de la régulation de l'assemblage/désassemblage des adhérences pour la migration cellulaire.

1.3.6 Intégrines et sites adhésifs : Introduction à la coopération entre $\beta 1$ et $\beta 3$

Nous avons vu jusqu'à maintenant que la coordination entre les remaniements de l'actine et des intégrines étaient importantes pour l'étalement de la cellule, ainsi que pour la migration.

Etant le lien essentiel entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire, les intégrines sont au coeur du processus de mécanotransduction. Les bases moléculaires de leur activité dans ce processus sont peu claires. Les intégrines

coopèrent sans se mélanger[116] dans le processus de mécanotransduction.

Sur des cellules uniques, il est possible d'étudier l'effet de la déplétion d'une intégrine sans pour autant empêcher la cellule d'adhérer, de migrer et de développer des forces sur son substrat. Des études sur cellules uniques ont permis d'étudier la forme, les forces exercées et les architectures mises en place selon la présence ou l'absence certaines intégrines, notamment les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ [146]. Il a été montré que dans le cas de la déplétion de l'intégrine $\beta 1$, les cellules ne s'étaient pas bien, formaient des plaques focales denses et établissaient des fibres de stress non contractile[121]. Dans le cas d'une déplétion de l'intégrine αv , majoritairement liée à la sous-unité $\beta 3$, les cellules sont bien étalées, forment un lamellipode ainsi que des complexes d'adhérences, mais peu d'adhérences focales matures. La présence des deux intégrines permet ainsi d'obtenir des cellules migrantes possédant à la fois des complexes focaux et des adhérences matures, démontrant l'aspect coopératif entre ces intégrines afin d'optimiser l'adhérence, la migration et le développement des forces sur le substrat[115, 121, 146]. Il est donc indispensable pour comprendre la mécanotransduction d'étudier les interactions entre $\beta 1$ et $\beta 3$.

1.3.7 Transmission biochimique de la force sur un système biologique

Comment cette information sur les propriétés mécaniques de l'environnement est-elle traduite bio-chimiquement par la cellule? Peu d'articles ont montré un effet direct des forces sur l'activité des protéines impliquées dans la mécanotransduction et en particulier les intégrines[63, 113, 118]. Nous pouvons cependant citer l'exemple de la taline. La taline est une protéine cytoplasmique servant d'activateur aux intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ ayant une affinité plus forte pour $\beta 3$ [4]. Capable de lier également l'actine, la taline permet donc à elle seule de créer un lien stable entre la cellule et le substrat. Elle a également la particularité de pouvoir changer de conformation[113]. Tout comme l'intégrine, elle possède une position fermée, ne permettant pas l'in-

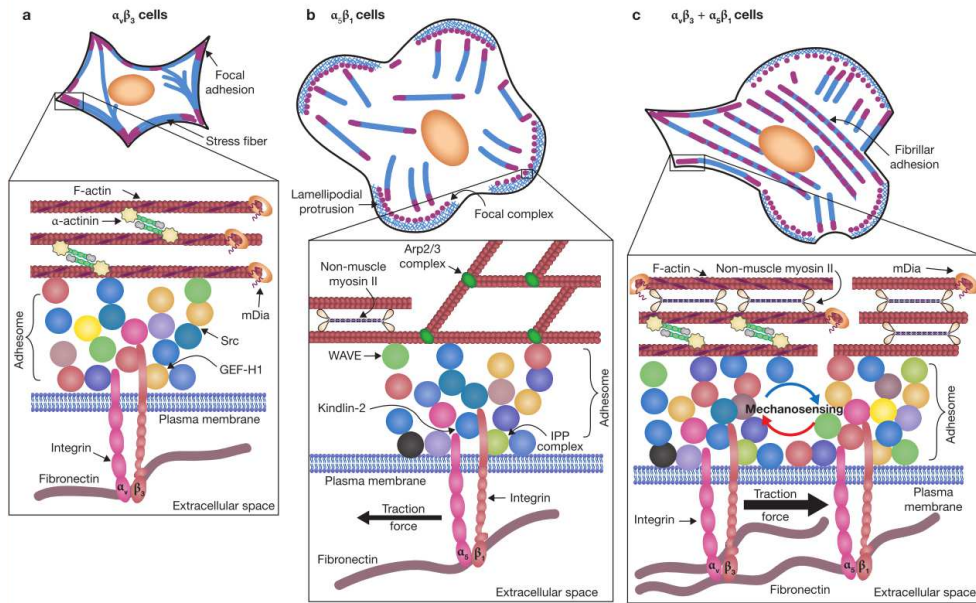


FIGURE 1.24: **Illustration de la coopération entre $\beta 1$ et $\beta 3$.**[146] a. En absence de l'intégrine $\beta 1$, les cellules forment des plaques $\beta 3$ soumise à de faible tension. b. En absence de l'intégrine $\beta 3$, la cellule forme des complexe focaux non matures riches en intégrines $\beta 1$ et développe un lamellipode continu sur toute la périphérie de la cellule. c. En présence des deux intégrines, la cellule est capable de réagir aux contraintes mécaniques imposées par son environnement et de moduler ces adhérences pour se déplacer.

teraction, avec par exemple la vinculine, un stabilisateur du lien entre l'actine et la taline. Sans tension, la taline reste en position fermée, et le lien actine-intégrine est fragile, et peut se rompre facilement. Sous tension, la taline va changer de conformation, et faire apparaitre des sites cryptiques qui sont des sites d'interactions avec la vinculine, stabilisant le lien entre la taline et l'actine, permettant ainsi à l'adhérence focale de supporter des tensions plus importantes[63, 113].

Un autre exemple est celui de p130cas [10, 50]. p130cas (Crk-associated substrate) est une protéine adaptatrice présente dans les adhérences focales ayant un rôle de régulateur essentiel dans les cellules saines et dans certaines pathologies[33]. Les protéines de la famille de Cas sont caractérisées par la présence de nombreux motifs conservés pour l'interaction pro-

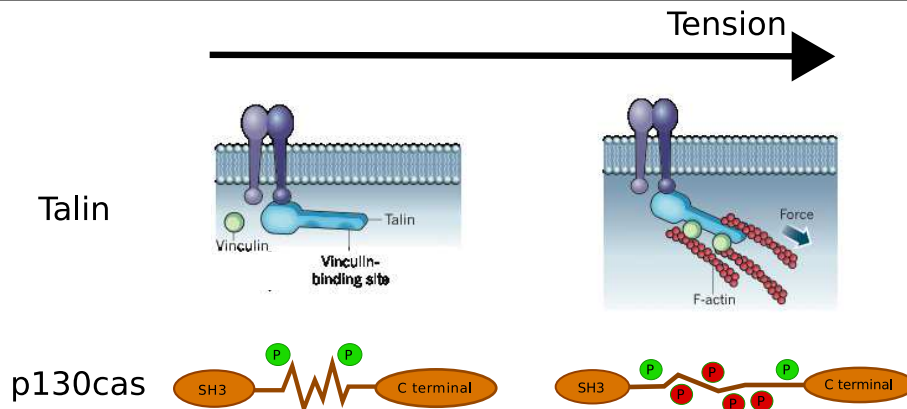


FIGURE 1.25: **Base moléculaire de la mécanotransduction.** Les forces ont comme effet de changer la conformation de certaines protéines tel que la taline[113] ou p130cas[50], exposant des sites particulier d'interaction pour la vinculine (pour la taline) ou de phosphorylation (pour p130cas).

téine/protéine et des régions riches en tyrosine et sérine phosphorylables. Elle joue un rôle dans de nombreuses voies de signalisation de par ces interactions avec les kinases comme FAK, les facteurs de croissance et les intégrines[130, 147]. Sous contrainte mécanique, p130 Cas va changer de conformations et révéler des sites cryptiques phosphorylables par les SFK (Src family kinase)[118, 130]. La phosphorylation-multiple de p130cas par SFK a pour effet de recruter de nombreuses protéines importantes, notamment pour l'étalement cellulaire[130].

Nous avons vu précédemment que la fonction des intégrines était modifiée par de nombreux facteurs cytoplasmiques. Ceux ci contrôlent la dynamique d'assemblage, la maturation, l'activation, et le désassemblage des adhérences. Un des défis importants de l'étude du vivant consiste à comprendre les processus physicochimiques qui permettent de relier les fonctions biologiques aux unités de bases des systèmes biologiques, telles que les protéines. Il a été démontré que de nombreuses fonctions cellulaires, tel que la migration, sont régies par des interactions protéines-protéines. Pour comprendre ces processus, il est indispensable d'étudier la dynamique et les interactions de ces protéines mécanosensibles responsable l'adhérence cellulaire et de la mécano-

transduction. La cellule est un organisme vivant capable de réagir de manière dynamique aux contraintes imposées. Étudier la dynamique des molécules responsables de cette réponse est donc essentielle pour la compréhension de la mécanotransduction cellulaire.

Dans la prochaine partie, nous verrons quels sont les différents outils optiques disponibles pour étudier la dynamique des protéines impliquées dans la mécanotransduction.

1.4 La microscopie pour la mesure de la dynamique moléculaire

La biologie cellulaire est née avec l'invention du premier microscope optique en 1674 par Antoni van Leeuwenhoek qui a permis la découverte par exemple des spermatozoïdes, puis des bactéries avec l'arrivée du premier microscope multi-lentilles dans les années 1820. Elle a cependant connu une deuxième révolution avec l'arrivée de la microscopie par épi-fluorescence.

La fluorescence se base sur l'émission par une molécule, dite fluorophore, d'un photon suite à l'absorption d'un photon incident (Figure 1.26).

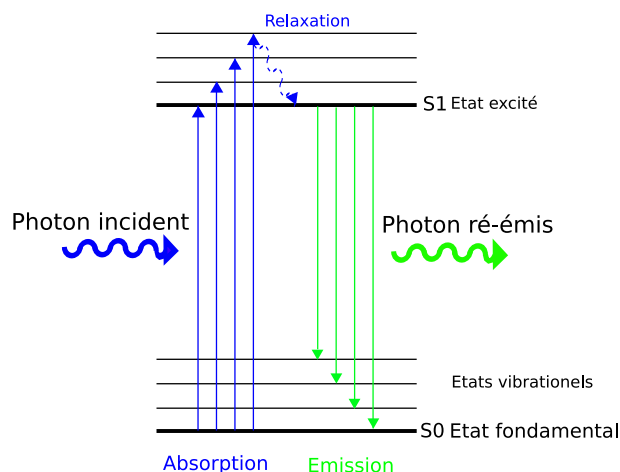


FIGURE 1.26: **Diagramme de Jablonski.** L'énergie d'un photon absorbé permet à un électron de passer de l'état fondamental S0 à l'état excité S1. Après relaxation, un photon peut-être ré-émis quand l'électron de l'état excité repasse à l'état fondamental. La perte d'énergie pendant la relaxation décale le longueur d'onde du photon émis vers les grandes longueurs d'ondes.

Il a ainsi été possible en faisant exprimer des fluorophores par des échantillons biologiques d'observer des organismes vivants et d'étudier le comportement de certaines protéines au cours de la vie cellulaire. Dans la pratique, l'expérience revient à illuminer l'intégralité de l'échantillon en 3D et à observer l'émission de fluorescence provenant de l'échantillon. Pour optimiser l'excitation des molécules et la détection des photons ré-émis, on met en place

sur le trajet optique un jeu de filtres pour illuminer à la fois l'échantillon avec une longueur d'onde contrôlée (en général courte) et ne recevoir sur le détecteur que la fluorescence provenant des molécules excitées (longueur d'onde en général supérieure). Le principal inconvénient de la technique vient du fait que les images peuvent être bruitées par l'émission de fluorescence des molécules se trouvant hors du plan de focalisation de l'objectif ainsi que par l'auto-fluorescence de la cellule. La microscopie par épi-fluorescence n'est donc pas adaptée à l'étude fine de dynamique de molécules, mais peut permettre l'étude de dynamique de structures. L'analyse des molécules à l'intérieur des structures a été permise par la création de la microscopie confocale, méthode plus sensible et plus résolue que la fluorescence classique.

La microscopie confocale est une variante de la microscopie par épi-fluorescence permettant de visualiser uniquement un plan de l'échantillon et ainsi de ne pas être bruitée par les zones hors focus. Le principe imaginé par Marvin Minsky en 1953, est de focaliser un faisceau laser sur l'échantillon déplaçable via un scanner galvanométrique afin de réaliser des images par balayage laser. Le faisceau laser traverse ainsi l'échantillon sous la forme d'un double cône avec un pic d'intensité au niveau du point focal. On conjugue ce point d'émission avec un trou appelé pinhole placé au niveau du plan image, permettant de n'observer que l'émission émise du point de focalisation, bloquant celle provenant des zones hors plan (Figure 1.27).

La taille du volume d'observation est dépendante de la taille du pinhole utilisée. On peut caractériser la fonction d'étalement du point, ou PSF⁸ du système optique. Cette technique de microscopie utilise généralement des détecteurs ponctuels de fluorescence de type PMT⁹ ou hybride HyD, ayant une surface de détection semblable à un PMT et la sensibilité d'une APD. Ces détecteurs ont la particularité d'avoir un temps de réponse assez court qui ouvre ainsi des possibilités pour la mesure de la dynamique de molécules fluorescentes dans un échantillon vivant.

8. Point spread function

9. Photomultiplicateur

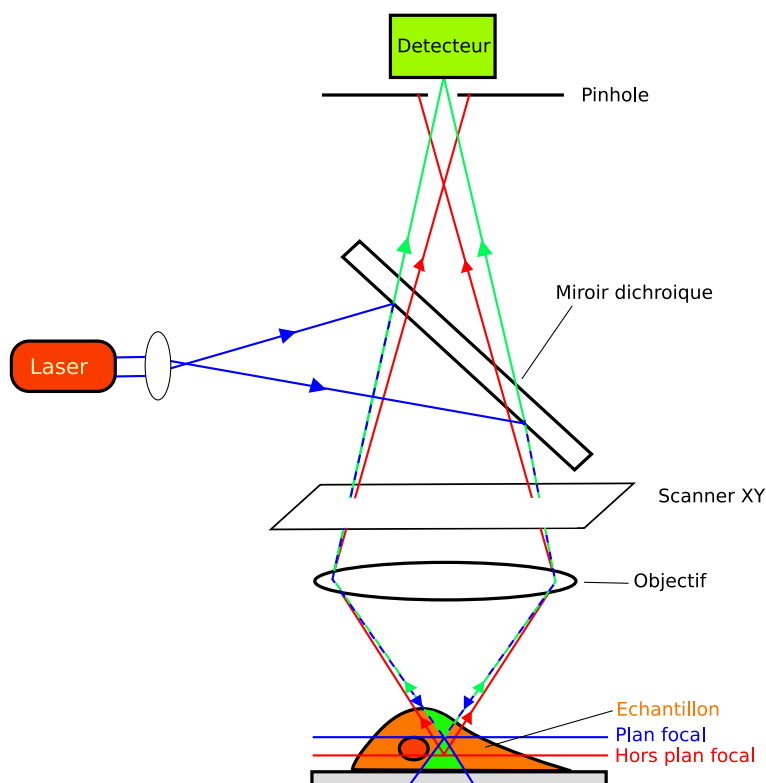


FIGURE 1.27: **Principe du microscope confocal.** En bleu le trajet optique du faisceau d'excitation. Toutes la zone colorée en vert dans l'échantillon sera excitée. Le trajet vert provenant du point de focalisation représente le faisceau qui sera capté par le détecteur, contrairement au faisceau rouge qui sera bloqué par le pinhole, permettant ainsi de ne visualiser qu'un volume défini de l'objet.

1.4.1 Mesure de mobilité par photoblanchiment

Une technique très utilisée en biologie pour estimer la mobilité d'une molécule fluorescente est la mesure de retour de fluorescence après photoblanchiment (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Le photoblanchiment est le phénomène d'extinction de l'émission de fluorescence par une molécule après qu'elle ait émis un certain nombre de photons (Figure 1.28). Seule l'arrivée (par exemple par diffusion) de molécule "fraîches" issues de l'extérieur de la zone photoblanchie permettra de récupérer la fluorescence dans la zone noircie. La vitesse de retour de fluorescence permet d'avoir une

estimation de la vitesse de diffusion des molécules dans l'échantillon.

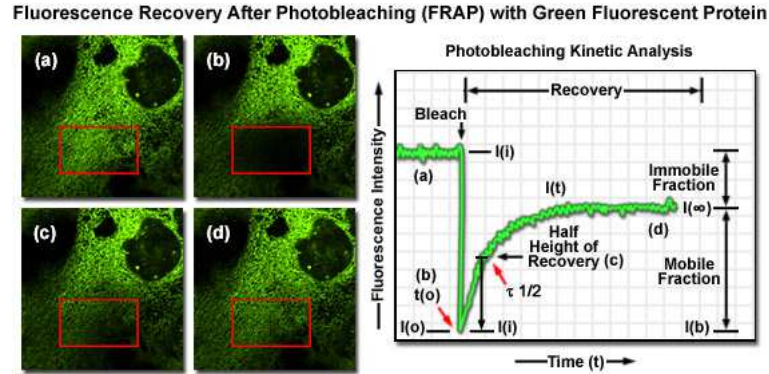


FIGURE 1.28: **Exemple d'une expérience de FRAP.** a. Image d'une cellule exprimant de la GFP dans son cytoplasme. Le rectangle rouge correspond à la zone blanchie étudié (b). c et d. Retour de la fluorescence dans le rectangle photoblanchie . A droite, la courbe d'intensité à l'intérieur du rectangle rouge en fonction du temps. Les caractéristiques de retour de fluorescence donnent des informations sur l'échantillon étudié, image extraite de <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/>

Cette technique conceptuellement simple permet l'étude de la dynamique de protéines marquées sur cellule vivante. La technique est adaptée à des protéines diffusant dans le noyau ou dans la membrane plasmique. Par exemple, la dynamique des intégrines a été étudiée par FRAP, en comparant les deux plaques d'intensité différente[8]. Le FRAP a ainsi permis de voir que la dynamique de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ -GFP était différente entre les plaques de forte densité et les plaques de faibles densité, le retour de fluorescence des intégrines dans les plaques de faibles densité étant plus lent. Cependant, le lien direct entre les forces de traction et la mobilité des intégrines est remis en cause, dû fait qu'il n'y a pas de lien entre la taille des adhérences, leur densité, et les forces de traction[7, 131].

Il s'agit d'une technique simple ne nécessitant qu'un microscope de type confocal. Elle permet d'avoir une idée qualitative de la diffusion, et de pouvoir comparer différents compartiments cellulaires. La valeur obtenue donne une information sur le comportement moyen d'une population de molécules fluorescentes dans l'échantillon. Elle ne permet cependant pas d'avoir facile-

ment une information sur la concentration. De plus, une étude sur des temps longs peut être perturbée par une transformation de la structure observée. De nombreuses corrections sont de plus nécessaires (dérive de la platine dans le plan d'observation, photoblanchiment du plan focal pendant l'acquisition, photoblanchiment des zones hors plan,...), ainsi que la nécessité de connaître les caractéristiques du microscope (taille de la PSF, volume réel photoblanchie, modèle d'ajustement,...). De plus, le fait de photo-détruire les molécules fluorescentes crée des radicaux libres qui peuvent causer des dégâts à la cellule. La gamme temporelle de cette technique ne permet pas l'étude de protéines en solution, car la vitesse d'acquisition d'un système de type confocal ne permet pas d'estimer proprement le temps de retour de fluorescence. L'étude de protéines très lentes voir immobiles ne peut pas non plus être envisager, dû fait du photoblanchiment important des espèces immobiles par le balayage laser. La technique de FRAP est donc parfaitement adaptée à l'étude de protéines diffusant librement dans la membrane. Elle reste néanmoins une technique auxiliaire simple et très intéressante pour comparer de manière semi-quantitative deux échantillons.

1.4.2 Super-résolution et mesure de mobilité par suivi de molécule unique

Le développement récent de technique de microscopie à haute résolution ouvre de nouvelles possibilités pour l'étude de la dynamique de molécules dans les adhérences focales. La combinaison de technique de type PALM¹⁰, qui ont permis l'étude de la dynamique de formation des complexes focaux[125] avec des techniques de mesure de mobilité permet d'étudier de manière fine la dynamique de molécules fluorescentes. Une des combinaisons possible est celle de la SPT¹¹ avec le PALM (Figure 1.29). La technique PALM consiste à illuminer une échantillon sur des temps très court pour visualiser la fluorescence que d'un fluorophore unique. La résolution optique

10. Photoactivated localization microscopy

11. Single particle tracking

d'un microscope confocale classique est dépendant du système optique utilisé (équation 1.1). En PALM, il est ainsi possible de localiser précisément la position d'un fluorophore unique en ajustant le profil d'émission par une fonction gaussienne en deux dimensions et ainsi améliorer la résolution de l'image jusqu'à quelques dizaines de nanomètres.

$$d = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (1.1)$$

La technique de Single Particle Tracking consiste à suivre une particule fluorescente pour reconstituer sa trajectoire. On peut ainsi identifier par exemple un transport actif ou une barrière physique perturbant la diffusion. En cas de déplacement aléatoire, il est possible d'extraire une constante de diffusion. Le SPT est adapté à des déplacements lents tel que des protéines membranaires, et permet notamment l'étude des fractions immobiles identifiées par FRAP[119]. Contrairement au FRAP, cette technique permet l'étude de molécules uniques et d'en déduire le comportement moyen d'une molécule. Elle nécessite donc d'analyser un nombre important de trajectoire.

La première expérience de SPT a été effectuée en 1982 par Barak et Webb sur des récepteurs de lipoprotéines marqués avec des fluorophores. Cependant, les fluorophores étant capable d'émettre un nombre fini de photons, ils ont tendance à blanchir après un certain temps d'exposition, et leur suivi devient donc impossible. De nombreuses améliorations ont été apportées depuis, tel que l'utilisation de quantum dots ou de nano-billes d'or pour pallier au photoblanchiment des fluorophores[35], ou encore l'amélioration de la précision de détection à 3D tel que l'utilisation d'un microscope à plan multifocal[109], permettant un suivi à l'échelle nanométrique sur des temps courts de quelques μs [52].

La PALM-SPT est donc la seule technique de mesure de dynamique de molécule ayant la résolution spatiale suffisante pour étudier les déplacements nanométriques. Dans le cas des intégrines, la PALM-SPT a permis d'étudier la différence de comportement de $\beta 1$, $\beta 3$ et de la taline à l'échelle nanométrique au sein d'une adhérence[116] (Figure 1.30). La SPT a permis de

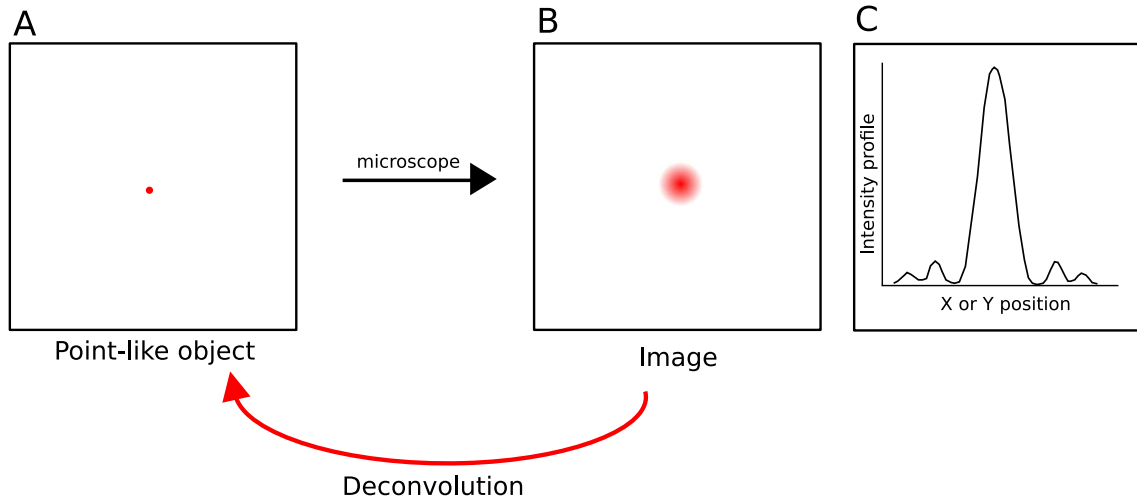


FIGURE 1.29: **Déconvolution de la PSF par PALM pour la SPT.** A. Visualisation d'un point sur l'échantillon. B. Image du point obtenue par microscopie (dirac). C. Profil de la tâche de diffraction obtenue sur le microscope. L'utilisation de lentille en microscopie fixe une limite de résolution dû à la fonction de transfert du système. En connaissant la réponse du microscope à un dirac, il est possible de connaître la fonction de transfert du microscope, et donc d'améliorer la résolution de l'image finale par déconvolution.

discerner trois modes de migration différents pour l'intégrine : 1) mode de diffusion libre à l'extérieur de la plaque d'adhérence. 2) mode de diffusion confiné dans l'adhérence focale. 3) mode immobile en corrélation avec l'activation de l'intégrine et sa liaison avec la taline et la matrice extra-cellulaire. La SPT montre que les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ se distribuent entre ces trois modes de diffusion. La fraction de $\beta 1$ immobile dans les plaques est plus importante que la fraction immobile de $\beta 3$. De plus, l'intégrine $\beta 3$ immobilisée reste stationnaire, alors que l'intégrine $\beta 1$ immobilisée montre un mouvement rétrograde, en corrélation avec le déplacement de la taline[65]. Contrairement aux intégrines, la taline semble avoir une dynamique particulière[116]. Les résultats de SPT montre que la taline ne diffuse par librement à la membrane, mais semble être directement recruter dans les adhérences focales depuis le cytoplasme pour s'immobiliser via son interaction avec le cytosquelette d'actine.

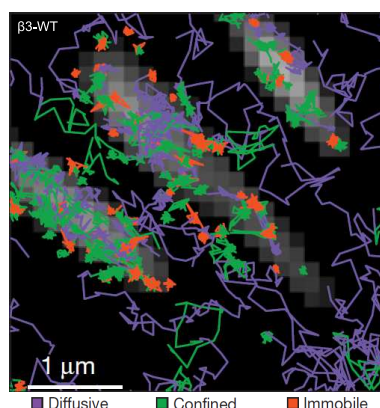


FIGURE 1.30: **La dynamique de $\beta 3$ décomposée en trois régimes de mobilités.**[116]. En gris le signal de fluorescence provenant de l'intégrine $\beta 3$. Les trajectoires des intégrines sont tracées en violet-vert-rouge selon le type de mobilité observé. On remarque une mobilité de type diffusive hors des plaques d'adhérences, confinée au niveau des adhérences, immobile à la périphérie des adhérences focales.

La limitation technique de la SPT est due à la sensibilité de la chaîne de détection, ainsi qu'à la stabilité mécanique de l'appareil qui peut être estimée en observant des échantillons statiques. Une acquisition de SPT dure typiquement quelques secondes. Cependant, il est compliqué, à partir d'une seule trajectoire, de connaître le type de diffusion observé. Il est donc souvent nécessaire d'effectuer ces mesures sur de nombreuses particules et de regarder le comportement moyen pour décider du modèle de diffusion à appliquer. Surtout, la technique se limite à observer une région d'intérêt de quelques microns uniquement et ne permet pas l'étude d'une cellule à l'échelle entière. Des techniques alternatives comme celles basées sur les fluctuations de fluorescence donnent des informations statistiques par nature sur des échelles de temps et spatiales extrêmement variées.

1.4.3 Intérêt des techniques de fluctuation de fluorescence

Le déplacement rapide de molécule dans l'échantillon crée parfois des artéfacts très ennuyeux sur une image. Cependant, il est possible d'exploiter ce bruit généré par la dynamique des molécules pour obtenir des informations sur la molécule. C'est justement les principes des techniques de fluctuations, qui ont progressivement émergé depuis l'invention de la spectroscopie de corrélation de fluorescence. Au cours de cette thèse, j'ai utilisé de nombreuses techniques basées sur les fluctuations de fluorescence, permettant d'avoir des informations diverses sur l'échantillon. Toutes les techniques présentées sont des variantes de la technique appelé Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) utilisée pour la première fois en 1972.

L'idée de la FCS est de focaliser un laser dans un échantillon fluorescent, et d'observer les fluctuations de la lumière émise en fonction du temps, directement liées à la concentration de molécule ainsi que leur dynamique dans l'échantillon (Figure 1.31).

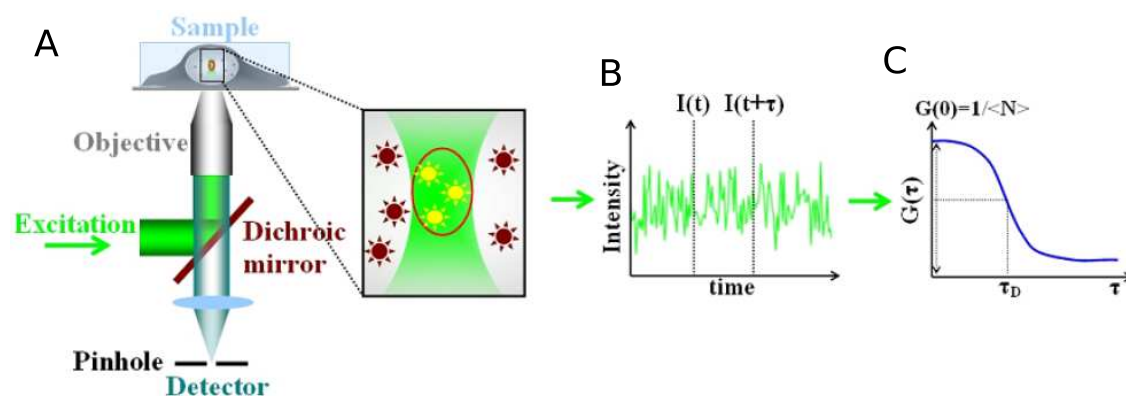


FIGURE 1.31: **Principe de la FCS.** A. On focalise un laser à l'intérieur d'un échantillon et on enregistre les fluctuations de fluorescence dans le temps (B). C. L'autocorrélation de ce signal permet d'obtenir des informations sur la mobilité et la concentration des molécules fluorescentes dans l'échantillon. Image extraite de la thèse de Meike KLOSTER-LANDSBERG.

Au moment des premiers travaux dans les années 1970, le laser d'excita-

tion était focalisé avec un waist de quelques dizaines de microns de diamètre dans une cellule d'épaisseur millimétrique. La taille considérable de ce volume d'observation rendait les mesures difficiles en raison de la faible amplitude des fluctuations de fluorescence. Par exemple, une solution de quelques nM contenant environ 10 000 molécules par volume d'observation et la sortie d'une de ces molécules induirait un changement de signal de 0.01%. Un inconvénient majeur de la technique est donc la nécessité de travailler à faible concentration et avec de faible volume d'observation de façon à ce que le nombre moyen de molécules observées soit compris entre 0,1 et 1000.

Pendant les années 90, des améliorations techniques ont permis d'élever la FCS d'un statut de méthode extrême à celui d'une méthode accessible en biophysique. La plus importante de ces améliorations est la réduction du volume d'observation par l'utilisation d'un objectif de grande ouverture numérique en configuration confocale (rayon typique de quelques centaines de nm). De plus, l'apparition de nouveaux détecteurs tels que les APD plus sensibles que les PMT, ont permis la réalisation d'expériences à très faible concentration et donc à forte fluctuations de fluorescence[78, 122]. Cependant, la technique est plus adaptée à des dynamiques rapides tel que la diffusion en solution et est très sensible aux agrégats de protéines. De plus, l'information ne provenant que d'un point de l'échantillon, la technique n'est donc pas optimale pour l'étude de la cellule entière. Nous nous sommes donc intéressés à des techniques de mesures de mobilités pouvant s'effectuer à l'échelle de la cellule entière : les méthodes d'Image Correlation Spectroscopy. Ces méthodes se basent sur les fluctuations de fluorescence au sein d'une image, mais sont des techniques complémentaires donnant accès à des informations différentes (Figure 1.32).

La corrélation temporelle d'une pile d'image (TICS)

Pour étudier des molécules lentes, le temps d'acquisition nécessaire pour obtenir par FCS un rapport signal à bruit correct implique un temps d'acquisition important (plusieurs minutes pour des protéines membranaires),

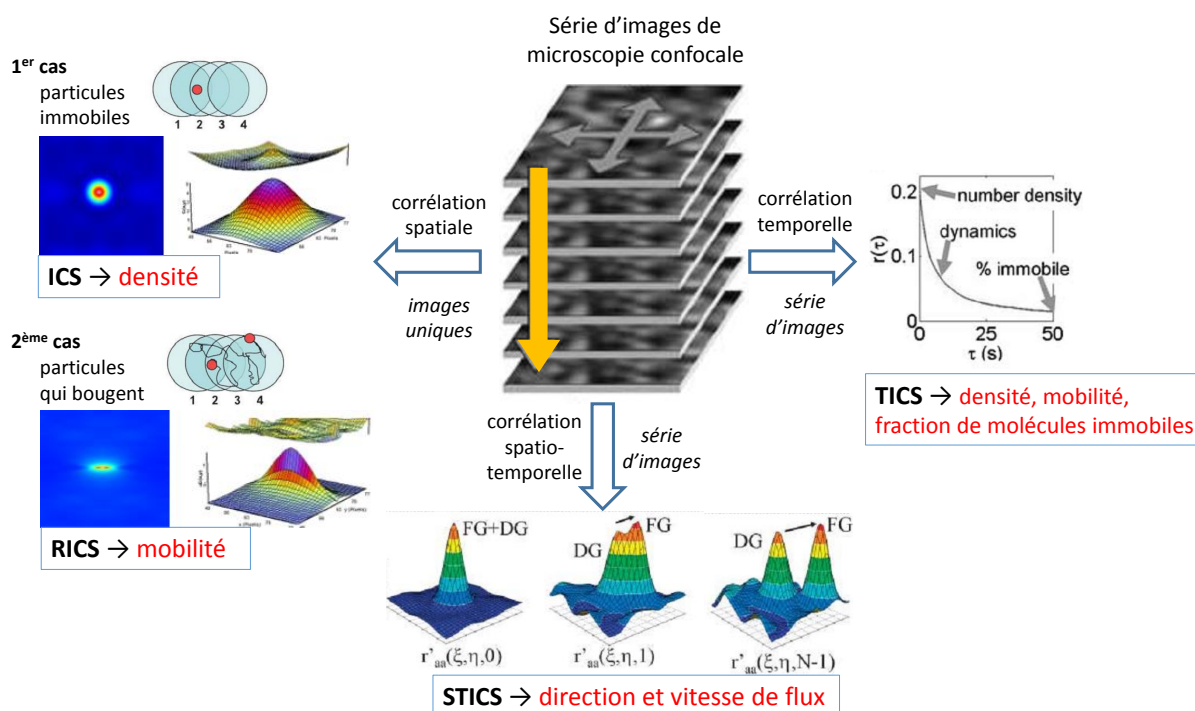


FIGURE 1.32: Les différentes techniques d'ICS. Résumé des différentes techniques utilisant la corrélation d'une pile d'image pour en extraire des informations tel que la concentration, la mobilité, la vitesse d'un flux, une fraction de molécule immobile. Figure adaptée depuis [41, 62, 79]

induisant des problèmes tels que le photoblanchiment ou la dérive de la platine. La technique appelée Image Correlation Spectroscopy propose d'utiliser la corrélation purement spatiale dans une image de type confocal pour avoir une information sur la densité des protéines fluorescentes. Elle ne permet pas cependant d'avoir une information sur la dynamique des molécules dans l'image[103].

Il est cependant possible d'observer pendant plusieurs minutes l'échantillon et de calculer la corrélation temporelle au niveau de chaque pixel, constituant ainsi une forme de FCS massivement parallèle. La mesure de la corrélation temporelle en fonction du temps entre les images donne une information directe sur la mobilité des molécules dans l'échantillon. Cette technique est appelée temporal Image Correlation Spectroscopy (tICS) (Fi-

gure 1.33). Le temps d'acquisition entre les images étant cependant assez long ($\sim 1\text{sec}$), elle ne permet pas d'observer la dynamique des molécules rapides ($D_{max} = 10^{-2}\mu\text{m}^2/\text{sec}$).

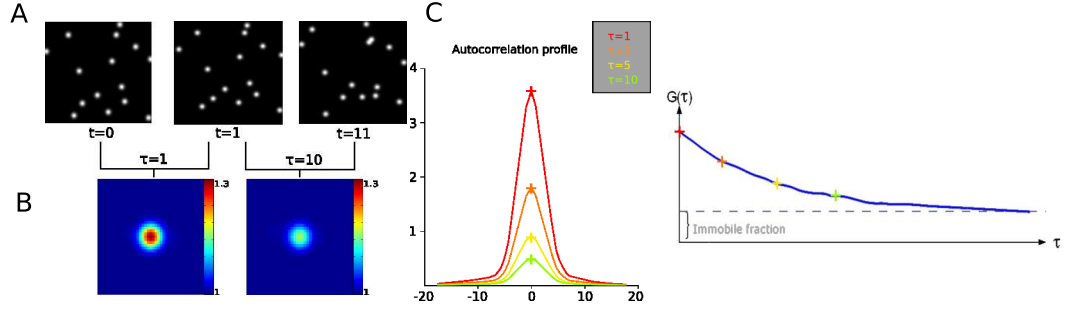


FIGURE 1.33: **Principe du tICS** A. Film d'un échantillon de billes fluorescentes. B. Figure de la corrélation entre les différentes images séparée d'un temps τ . C. Profil de la courbe de corrélation selon tau. Le principe est d'utiliser la persistance de l'amplitude de la corrélation spatiotemporelle (à décalage spatiale nul) entre les différentes images séparées d'un temps (τ) pour obtenir des informations sur la mobilité des molécules et leurs concentrations dans l'échantillon.

Elle a été utilisée et décrite la première fois en 1996 pour étudier la dynamique de molécules lentes en milieu visqueux[127]. L'analogie est très forte avec la FCS, de par le fait que la corrélation du signal n'est que temporelle, mais avec un temps d'échantillonnage beaucoup plus long ($\sim\text{ns}$ pour la FCS, $\sim\text{sec}$ pour la tICS). Le gros avantage de la technique est qu'elle permet de faire une mesure sur la dynamique de molécules ainsi que leur concentration sur un champ de vue très large. L'utilisation de détecteurs de fluorescence très sensibles permet de travailler avec des temps d'intégration par pixel petit et de réduire le photoblanchiment.

La technique a permis l'étude de la dynamique de l'intégrine $\alpha 5$ dans les adhérences naissantes et dans les adhérences focales, montrant une concentration trois fois plus importante dans les adhérences focales. En terme de dynamique, $\alpha 5$ a une dynamique plus rapide, ainsi qu'une fraction immobile beaucoup plus faible dans le lamellipode comparée aux adhérences au centre la cellule[142].

Elle est donc particulièrement adaptée pour l'étude de la mobilité de molécules fluorescentes à l'échelle de la cellule entière, permettant ainsi de comparer différents compartiments cellulaires, et ainsi contrôler la variabilité intra-cellulaire (Figure 1.34).

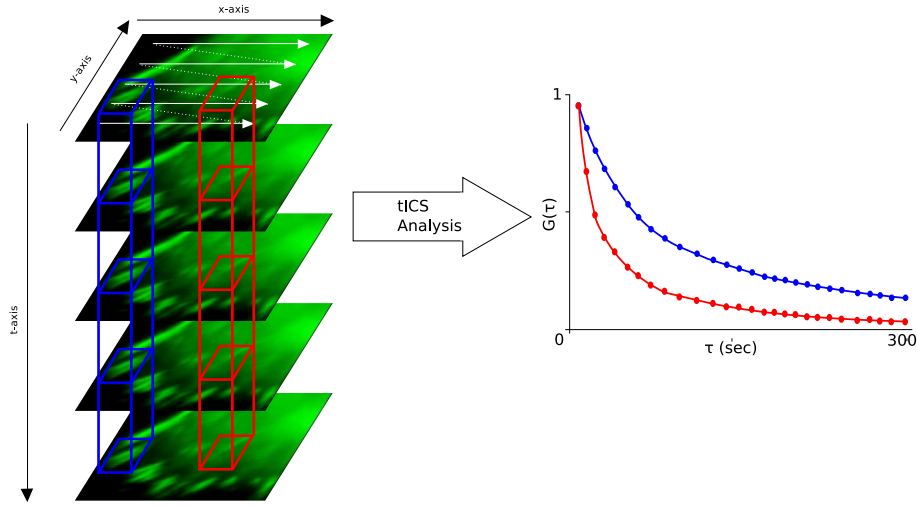


FIGURE 1.34: **Exemple de segmentation pour l'analyse de tICS.** Dans cette illustration, les zones bleue et rouge correspondent à des régions plaques et hors plaques d'adhérences. En observant le déclin de l'amplitude de la corrélation dans le temps, il est possible de voir une différence de comportement sous la forme d'une perte de corrélation plus rapide pour la zone rouge, indiquant une mobilité des molécules plus importante.

Le temps entre les images étant typiquement de l'ordre de la seconde, la technique est adaptée à l'étude de mobilité de molécules lentes comme pour les protéines transmembranaires.

La corrélation spatiale et temporelle d'une pile d'image (STICS)

La tICS nous donne des informations sur la mobilité des molécules sans identifier facilement la nature de cette mobilité (diffusion, transport, interactions). Au lieu d'utiliser la variation temporelle de l'amplitude du centre spatiale de l'auto-corrélation spatio-temporelle pour obtenir des informations sur l'échantillon, le STICS propose d'étudier la variation de la forme globale ou le déplacement du maximum de l'auto-corrélation spatio-temporelle pour

permettre d'identifier une diffusion, des interactions ou d'observer des flux. La technique a par exemple permis l'étude de flux de vésicule dans l'apex des plantes[16].

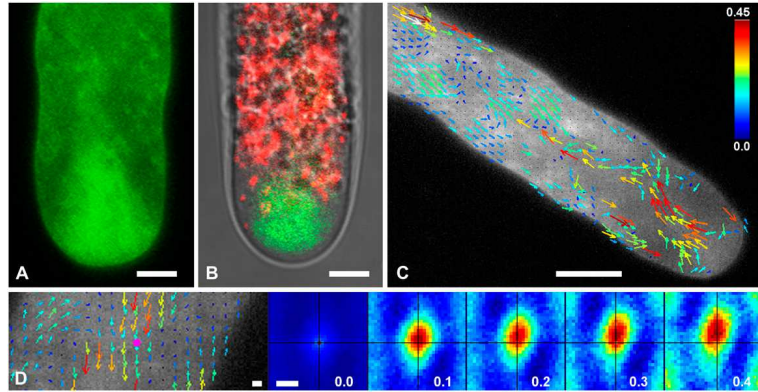


FIGURE 1.35: **Exemple d'application du STICS[16].** A. Fluorescence provenant d'un marqueur de vésicule. B. Même échantillon avec visualisation des mitochondries, illustrant la non-colocalisation entre les mitochondries et les vésicules. C. Superposition du canal et des différents vecteurs de trajectoires mesurées par STICS. D. Exemple de l'évolution de la fonction de corrélation du vecteur magenta sur l'image à gauche. On remarque une vitesse de flux important au centre du canal remontant le canal vers la zone concentrée en mitochondrie. Barre d'échelle = $10\mu\text{m}$

Le STICS a également permis l'étude de protéines impliquées dans la mécanotransduction, telle que l'actine et l'identification de son mouvement rétrograde vers l'intérieur de la cellule[18], ainsi que le flux corrélé dirigé entre l'intégrine $\alpha 5$ et l' α -actinine[18, 62].

La corrélation spatio-temporelle d'une image unique (RICS)

En tICS et en STICS, la fréquence d'acquisition des images ($\sim 1\text{sec}$) limite ces techniques à l'étude de molécules très peu mobiles. La technique appelé Raster-Scan Image Correlation Spectroscopy (RICS) est une technique alternative permettant l'étude de molécules plus rapides présentant l'avantage d'un champ de vue pouvant aller jusqu'à une dizaine de microns et ce avec un microscope de type confocale standard.

Elle se base sur la corrélation de fluorescence entre pixels et voisins pour avoir une information sur la concentration et la vitesse des molécules fluorescentes (Figure 1.36 a.). Cette technique est très dépendante des paramètres d'acquisition (Figure 1.36 b.). Il faut en effet s'assurer qu'il y ait un recouvrement suffisant des PSF entre un pixel et son voisin pour faire un bon suivi de particule (sur-échantillonnage de la PSF), ainsi qu'une vitesse de balayage adaptée à la mobilité des molécules. Par exemple, en cas de balayage trop rapide, la molécule identifiée au pixel 1 n'aura pas le temps de se déplacer au pixel 2.

Elle a permis l'étude de nombreuses protéines impliquées dans les adhésions focales telles que la paxilline[17, 39], ou FAK[40]. Plusieurs points négatifs rendent tout de même la technique compliquée à utiliser. Tout d'abord le fait qu'il est nécessaire de prendre plusieurs images pour avoir une statistique suffisante, introduisant une photodestruction des fluorochromes, ayant un impact sur le comportement cellulaire et sur le résultat final puisque les molécules les moins mobiles sont éliminées par photoblanchiment. De plus, l'acquisition d'un film sur un grand champ impose de suivre la cellule pendant plusieurs dizaines de minutes, temps parfois supérieur au temps de vie de la structure étudiée. Cette technique est également difficile à analyser et interpréter due à la difficulté à décorréler l'information spatiale et temporelle. Il est cependant possible d'accéder simultanément à des vitesses de diffusion très différentes en utilisant la corrélation des pixels séparés d'un temps court sur la même ligne et la corrélation des pixels séparés d'un temps long entre lignes différentes.

Toutes ces techniques d'ICS sont donc complémentaires et utiles pour l'étude d'échantillons biologiques vivants. La FCS ne semble pas adapter à l'étude de protéines transmembranaires, la mobilité des intégrines étant trop faible pour être observées avec une technique de mesure si rapide. Les mesures de FRAP ont permis d'apprendre que les intégrines $\beta 3$ ont une dynamique différente en fonction de leur état de maturation[8]. Les mesures de PALM-SPT montrent que les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ ont une dynamique

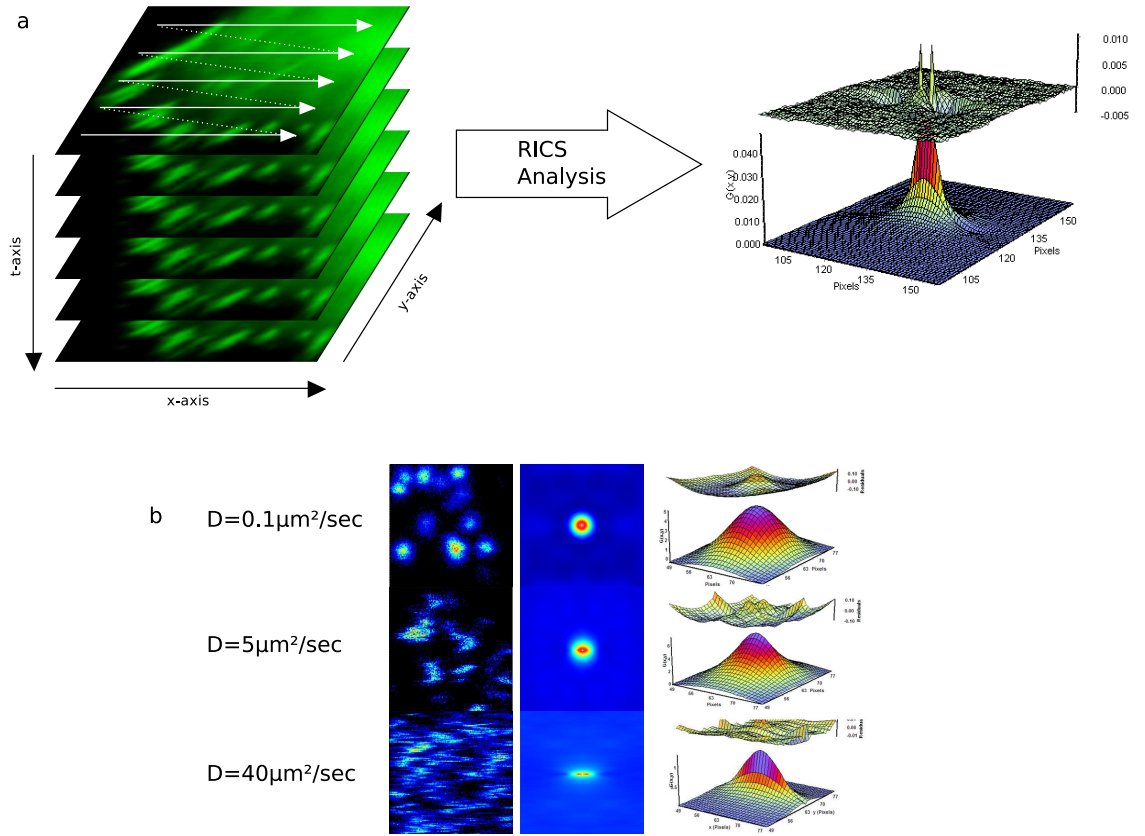


FIGURE 1.36: **Principe du RICS** a.Type de scan utilisé dans nos expériences b.Image issue de la présentation de E.Gratton (7th Workshop "Advanced Fluorescence Imaging and Dynamics"). On remarque à vitesse de scan constant que la dynamique des molécules dans l'image a un impact fort sur la qualité de l'image et sur la forme de l'autocorrélation de l'image. Quand la vitesse des molécules est faible comparé à la vitesse de scan, les billes ont une forme circulaire. Quand la vitesse devient comparable à la vitesse du scan, on observe une trainée due au déplacement de la particule. L'autocorrélation devient alors allongée dans la direction du scan.

différente et que la taline est recrutée dans les adhérences focales directement depuis le cytoplasme[116]. Les mesures de STICS indiquent que les intégrines semblent se désengager en migrant préférentiellement vers l'intérieur de la cellule, suivant le flux rétrograde d'actine[18, 62]. Cependant, aucune étude à ce jour n'a été consacrée au lien entre les forces de traction et la mobilité des intégrines.

Chapitre 2

Objectifs et Stratégie

La compréhension du processus d'encodage des forces de traction en signal biochimique est complexe du fait de la diversité des protéines mises en jeu ainsi que la difficulté à relier tout ces partenaires protéiques entre eux. De plus, les différentes dynamique observées sur ces protéines implique une utilisation et un développement très exigeant de techniques optiques de mesure de mobilité. Des études récentes ont montré que la capacité des cellules à exercer des forces était essentielle à la cellule pour sentir les propriétés mécaniques de l'environnement[46]. Dans ce travail, il est démontré qu'en incubant des cellules souches sur des substrats avec des rigidités différentes, il était possible d'orienter la différenciation des cellules souches. Il a aussi été montré que les forces avaient un impact sur l'activité de certaines protéines tel que la taline ou p130cas.

Le but de cette étude est d'explorer l'impact des forces cellulaires sur le comportement des intégrines en terme de concentration et de dynamique. L'activité des intégrines étant d'osciller entre un état de faible et forte affinité pour la matrice ayant comme impact de modifier sa mobilité, il nous paraissait important de pouvoir lier cette mobilité au niveau de tension dans les adhérences focales[63, 144]. Notre première idée avait été d'observer le comportement des intégrines en termes de mobilité et de concentration en disposant les cellules sur différents substrats avec des rigi-

dités différentes. Or, l'utilisation d'un changement de rigidité pour étudier la mécanotransduction est sujet à controverse[46, 131, 141]. La raison de cette remise en cause serait que le changement de rigidité d'un gel de polyacrylamide a pour effet, entre autre, de modifier la taille des pores du gel à cause du changement de nombres de liaisons entre l'acrylamide, changeant ainsi localement la concentration en fibronectine ainsi que le relief du substrat[64]. Il est donc difficile de décorréler l'effet du changement de rigidité avec celui du changement de structure locale de la matrice extra-cellulaire. Un autre problème qui s'est présenté avec l'utilisation du gel de polyacrylamide vient du fait qu'il est difficile de voir se former des adhérences focales sur ces gels mous. Or, étant intéressé par le lien entre les forces exercées et le comportement des intégrines notamment au sein des plaques focales, il nous fallait trouvé un autre type de substrat.

Notre solution a été d'utiliser un motif de protéines de la matrice sur une lamelle de verre pour pouvoir contrôler la géométrie de la cellule et répondre à trois impératifs.

Le premier impératif est de pouvoir fixer la forme de la cellule, ainsi que sa surface d'adhérence, pour ainsi limiter la variabilité intercellulaire, et ne pas comparer des cellules rondes à des cellules allongées ou des cellules peu étalées à des cellules très étalées.

Le deuxième impératif est de pouvoir utiliser des outils statistiques pour quantifier les différents comportements et trouver ainsi des différences significatives.

Le troisième impératif et le plus ambitieux est de mettre un lien de causalité entre la tension cellulaire et la mobilité des intégrines. Il faut donc pour cela générer un différentiel de tension au sein de la même cellule. Cela permettrait de pouvoir comparer différentes régions avec des tensions cellulaires différentes au sein de la même cellule dans les mêmes conditions.

Les objets étudiés sont les protéines mécanosensibles liant mécaniquement l'intérieur et l'extérieur des cellules et dont leur régulation par rapport aux tensions cellulaires sont peu connues. Notre choix s'est porté sur les inté-

grines, protéines mécanosensibles transmembranaires jouant un rôle central dans le processus de mécanotransduction, responsable du lien entre le substrat et le cytosquelette d'actine, formant des structures très dynamiques et très complexes appelées adhérences focales et dont l'assemblage et le désassemblage permet à la cellule de se déplacer et d'exercer des forces sur le substrat.

Des études récentes ont montré que l'intégrine $\alpha5\beta1$ et $\alpha v\beta3$ sont les principales intégrines impliquées de la génération de force sur fibronectine, $\beta1$ jouant le rôle de générateur de force, et $\beta3$ jouant le rôle de régulateur de $\beta1$ [92, 108, 114, 116]. Il a également été montré que les intégrines $\beta1$ et $\beta3$ semblent avoir une dynamique différente et que les intégrines $\beta3$ dans les plaques de faibles et fortes densités semblent avoir des dynamiques différentes[8, 116]. De plus, les intégrines $\beta1$ et $\beta3$ semblent réagir de manière différente à la tension[121]. En effet, le fait de bloquer la contractilité semble avoir un effet fort sur les intégrines $\beta3$ et très peu sur les intégrines $\beta1$.

Notre idée a été d'approfondir cette question en étudiant grâce à notre technique de micromotif l'impact de la tension sur la dynamique et la densité des intégrines $\beta3$ et $\beta1$ et en identifiant les interactions importantes dans le processus de régulation de la dynamique des intégrines en réponse à la contrainte mécanique. Pour avoir accès à ces informations, nous nous baserons sur une technique exploitant les fluctuations de fluorescence qui donne accès au nombre de molécules ainsi qu'à leur dynamique, appelée temporal Image Correlation Spectroscopy.

Chapitre 3

Matériel et Méthodes

3.1 Microfabrication

Le contrôle spatial de l'adhérence de cellule vivante est un enjeu crucial et un élément central dans de nombreuses études biomédicales et pharmaceutiques. Elles permettent de contrôler la position des cellules, leur surface d'étalement et leur forme. Cela permet donc de poser des conditions de bords aux cellules, et ainsi limiter la variabilité intercellulaire pour opérer des analyses statistiques sur plusieurs cellules. Il est également possible de forcer l'interaction entre deux cellules, ou à l'opposé d'étudier des cellules uniques en imposant leur forme et leur direction de migration. Le micromotif est ainsi devenu une technique avantageuse pour étudier la réponse cellulaire au condition environnemental, grâce par exemple au développement récent de substrat modifiable dynamiquement par laser [135], ou thermosensible[89]. Dans cette étude, le principe a été d'utiliser un motif adhésif en flèche pour créer un différentiel de tension au sein de la même cellule.

3.1.1 Protocole pour la conception de motif adhésif sur verre

Le principe de fabrication de motif adhésif sur verre est basé sur la création d'un contraste adhésif pour la cellule, entre dans notre cas, de la fibronectine (composant de la matrice extracellulaire reconnu par $\beta 1$ et $\beta 3$), et une brosse de P-NIPAM¹ non adhésive. Tout d'abord, on greffe de manière covalente un groupement silane conjugué avec un groupement amine réactif (APTES²) sur une lamelle de verre (Figure 3.1 étape 1). Le greffage est réalisé en plaçant les lamelles de verre nettoyées dans un nettoyeur plasma à vapeur d'eau, rendant la surface momentanément hydrophile. En immergeant ensuite la lamelle dans une solution contenant du dichlorométhane, du TEA³ et du BMBP⁴, la surface deviendra alors hydrophobe, le brome servant ainsi d'initiateur de polymérisation pour la brosse non-adhésive (Figure 3.1 étape 2). En disposant ensuite un photomasque en quartz avec des motifs négatifs de chrome, il est possible, en disposant le tout sous une illumination UV à 180nm de photodétruire l'initiateur à certains endroits de la lamelle pour créer nos motifs (Figure 3.2). Le quartz étant transparent aux UV, la lumière ira photodétruire l'initiateur à ces endroits, et pas au niveau du chrome. La croissance de la brosse se fera ensuite par transfert successif de radicaux (aussi appelé ATRP⁵)[89] (Figure 3.1 étape 3).

Il est possible de contrôler la taille de la brosse en laissant réagir plus ou moins longtemps la surface avec le monomère. En immergeant ensuite cette lamelle dans une solution contenant 20 μ g/ml de fibronectine, qui viendra se déposer aux endroits où il n'y a pas de brosse, nous obtiendrons finalement une lamelle de verre avec des motifs de fibronectine permettant de contrôler la géométrie de la cellule. Toutes les expériences de cette thèse ont été réalisées avec une concentration en fibronectine de 20 μ g/ml et de 10 μ g/ml de

-
1. Poly-(N-isopropylacrylamide)
 2. Aminopropyltriethoxysilane
 3. Triéthylamine
 4. 2-Bromo-2-méthylpropionyl
 5. Atom Transfer Radical Polymerization

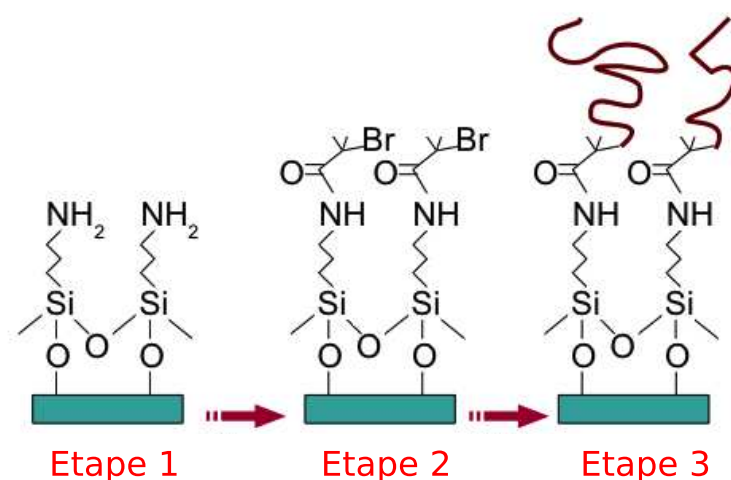


FIGURE 3.1: Les différentes étapes du greffage de NIPAM sur verre.

La première étape consiste au greffage d'un groupement amine réactif sur une lamelle de verre. La deuxième étape consiste à exposer un groupement bromé pour pouvoir effectuer une brosse par transfert successif de radicaux (étape 3).

fibrinogène fluorescent dans les cas où nous voulions visualiser le motif par fluorescence (Plus de détails en annexe).

3.1.2 Protocole pour la conception de motif adhésif sur gel

De nombreuses études de biologie s'effectuent sur des substrats mous pour se rapprocher des conditions physiologiques[42, 46, 131], et effectuer des mesures de forces de traction[90, 97]. Pour effectuer cela tout en conservant l'avantage de l'outil statistique, nous avons développé une technique pour créer des motifs adhésifs sur gel mou. L'idée était d'utiliser le fait que notre technique de motif sur verre ne contient pas de lien chimique fort entre la lamelle et la protéine de la matrice pour l'utiliser comme patron et transférer ensuite les protéines sur le gel. Il serait donc possible en incluant la matrice dans un gel de l'extraire pour ainsi obtenir un substrat avec un motif adhésif à la surface. Pour optimiser cela, nous avons fait pousser une brosse longue

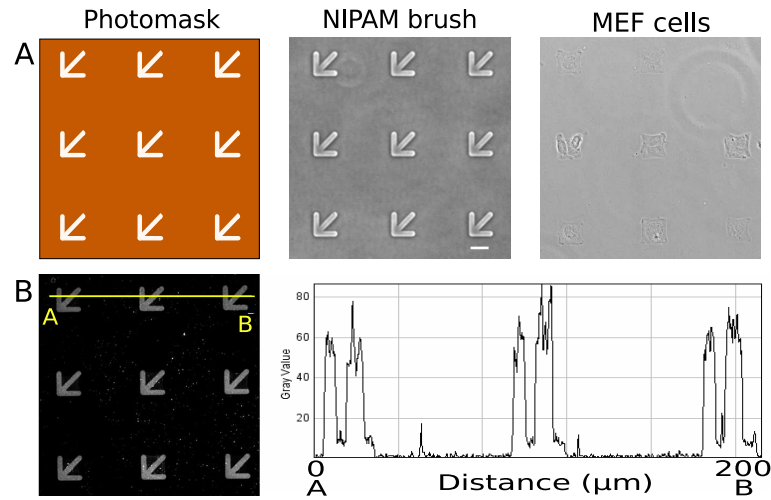


FIGURE 3.2: **Contrôle de l'adhérence cellulaire sur verre.** A. Image du photomasque utilisé pour les micromotifs sur verre, ainsi que l'image en contraste de phase où l'on voit en claire les zones sans brosse, puis finalement le contrôle de l'adhérence et de la forme des cellules. Barre d'échell = $5\mu\text{m}$. B. Image par fluorescence du micromotif de fibronectine rendue fluorescent par l'utilisation de fibrinogène fluorescent, ainsi que le profil d'intensité le long de la ligne. On voit clairement un contraste d'intensité entre les zones où la brosse est présente ou non.

(200nm de haut) et dense sur une lame de quartz de quelques centimètre d'épaisseur pour garantir la planéité de la surface (Figure 3.3 a.).

Après avoir mis une goutte de fibronectine ($20\mu\text{g/ml}$) et rincer le sur-nageant, on fait polymériser une solution de polyacrylamide contenant des billes fluorescentes sur la surface. En polymérisant, le gel va créer un lien mécanique avec la fibronectine (Plus de détails en annexe). En détachant le gel, on obtient donc une surface non adhésive plan avec des motifs de matrice extra-cellulaire permettant de contrôler la géométrie de la cellule, ainsi que des billes fluorescentes près de la surface utile pour faire des mesures de force de tractions (Figure 3.3 b.).

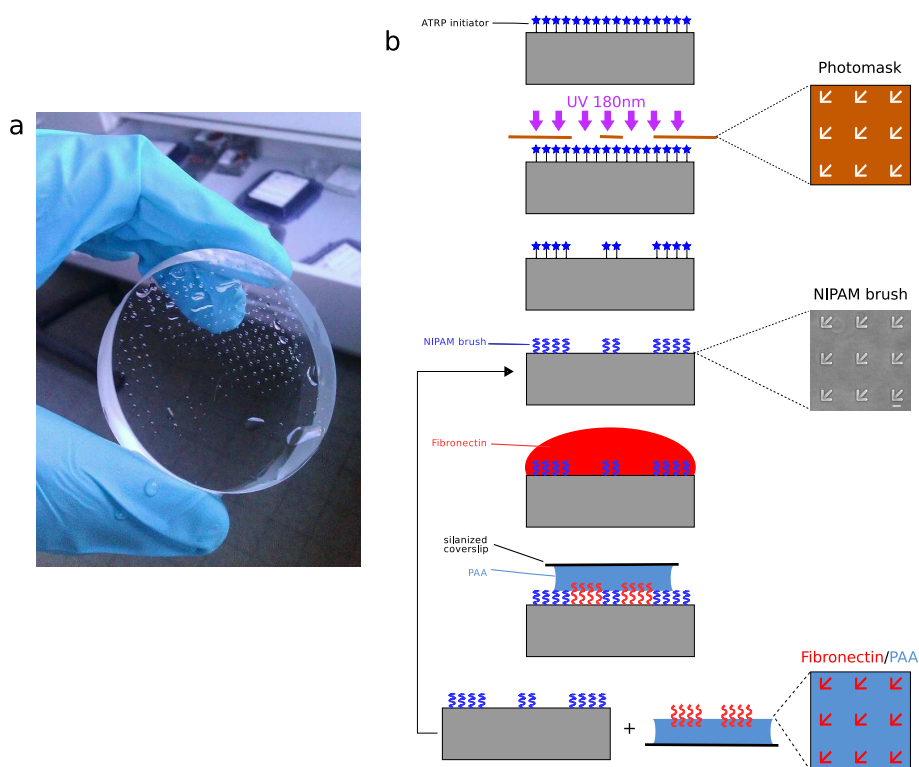


FIGURE 3.3: **Protocole de création d'un gel mou patterné par épilation** a.Patron servant à la conception de motif adhésif sur gel. b.Protocole de génération de micromotif de fibronectine sur gel mou.

3.2 Technique de mesure de mobilité

3.2.1 Par photoblanchiment

Le FRAP exploite le photoblanchiment de molécules[8]. Nous avons vu dans le chapitre précédent que le principe était de déstabiliser le système, du point de vue de la concentration locale de molécules, et d'observer le retour à l'équilibre. En pratique, la déstabilisation vient du photoblanchiment de molécules à l'intérieur d'une région d'intérêt. Cela se fait en augmentant brièvement l'intensité laser envoyée sur l'échantillon, pour détruire de manière irréversible les molécules fluorescentes. Après un certain laps de temps, temps dépendant de la mobilité de la molécule étudiée, on observe un retour de l'intensité de fluorescence dans la zone blanchie.

Les expériences de FRAP ont été faites au LIPhy sur le microscope confocal commercial Leica SP8 équipé d'un laser Argon, d'une diode DPSS561, et d'un laser HeNe. Nous avons utilisé un objectif à contraste DIC x40/1,3 à huile et un détecteur hybride HyD.

Lors de nos expériences, les tailles d'images étaient de 256x256 pixels de 180nm. Les fréquences d'acquisitions étaient de 1,15 images/seconde et le temps d'acquisition d'environ 3min. La puissance laser était typiquement de $2\mu W$ pendant l'acquisition, puis augmentée à $100\mu W$ pendant 5sec pour photodétruire les molécules fluorescentes. Des corrections sur le signal brut $Int(t)$ ont été faites en soustrayant le bruit de fond hors de la cellule (équation 3.1). Par ailleurs, seulement une partie de chaque plaque étudiée a été photoblanchie pour pouvoir utiliser l'autre partie de la plaque comme référence $Int_{ref}(t)$ et corriger le photoblanchiment dû à l'acquisition des images (équation 3.2).

$$Int_{temp}(t) = Int(t) - background(t) \quad (3.1)$$

$$Int_{corr}(t) = Int_{temp}(t) \times Ratio(t) \quad avec \quad Ratio(t) = \frac{Int_{ref}(\infty)}{Int_{ref}(t)} \quad (3.2)$$

La courbe d'intensité corrigée obtenue peut être ajustée avec une simple exponentielle du type (équation 3.3, $t=0$ au moment du photoblanchiment).

$$f(t) = A(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (3.3)$$

Plusieurs valeurs peuvent être extraites avec cette méthode : Le $t_{1/2}$, ou temps de demi-retour, correspond au temps nécessaire pour récupérer la moitié de la fluorescence totale, et la fraction immobile correspond à la fraction des molécules blanchies non récupérée après retour à l'équilibre (équation 3.4). La fraction immobile est calculée en faisant le ratio entre l'intensité moyenne de fluorescence avant le photoblanchiment (équation 3.4, $I_{init} = \langle Int_{corr}(t) \rangle_t$ pour $t < 0$) et la valeur de l'asymptote de la courbe d'ajus-

tement à un temps infini. L'ajustement de la courbe a été faite avec le logiciel OriginLab.

$$\tau = \frac{t_{1/2}}{\ln 2} \quad \%_{immo} = \frac{f(\infty)}{I_{init}} \times 100 \quad (3.4)$$

3.2.2 Par corrélation de fluorescence

Spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS)

La FCS se base sur les fluctuations temporelles de fluorescence pour avoir des informations sur la dynamique des molécules. Une fois la courbe de fluorescence obtenue, l'auto-corrélation du signal permet de mesurer le ou les temps caractéristiques des fluctuations, comme par exemple le temps moyen d'entrée et de sortie d'une molécule dans le volume d'observation (équation 3.5).

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta F(t)\delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} + 1 \quad (3.5)$$

Dans cette équation, $F(t)$ est le signal de fluorescence détecté, τ représente une intervalle de temps, δF sont les fluctuations du signal de fluorescence tel que $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$. On suppose ici que le signal est stationnaire.

La fonction d'auto-corrélation peut prendre différentes formes selon le ou les processus à l'origine des fluctuations. Une hypothèse habituelle consiste à décrire le volume d'observation comme une gaussienne allongée dans l'axe z , dont le rayon vaut ω_r dans le plan et ω_z dans la direction z [86]. Dans le cas courant d'une espèce diffusant librement en 3D, $G(\tau)$ s'écrit :

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D} \right)^{-1/2} + 1 \quad (3.6)$$

On remarque dans cette équation qu'à $\tau = 0$, $G(0) = 1 + \frac{1}{\langle N \rangle}$, c'est à dire que l'amplitude à l'origine diffère de l'unité par l'inverse du nombre moyen de molécules dans le volume d'observation $\langle N \rangle$.

Dans l'équation 3.6, le temps de diffusion τ_D est défini par $\tau_D = \omega_r^2/4D$

où D est la constante de diffusion de la molécule fluorescente. Le paramètre S est un facteur de forme du volume d'observation. Il s'agit du rapport de la dimension axiale sur la dimension latérale : $S = \omega_z/\omega_r$. Dans les cellules, les phénomènes à l'origine des fluctuations peuvent être plus complexes que la simple diffusion, tels qu'une superposition de modes de diffusion ou d'interactions entre les molécules. Les modèles utilisés peuvent inclure des espèces mobiles ou immobiles, un flux dirigé, ou des temps de résidence. Cependant cette équation permet de montrer que la fonction d'auto-corrélation donne surtout accès à deux types d'information, la concentration en fluorophores, qui peut se déduire du nombre de molécules $\langle N \rangle$ estimé et de la taille du volume d'observation (équation 3.7), et d'autre part la mobilité des espèces fluorescentes (équation 3.8).

$$C = \langle N \rangle / V_{eff} \quad V_{eff} = \left(\frac{\pi}{2} \right)^{3/2} \omega_r^2 \omega_z \quad (3.7)$$

$$D = \omega_r^2 / 4\tau_D \quad (3.8)$$

Une mesure de FCS ne dure en général que quelques secondes à quelques dizaines de secondes, ce qui est très court comparé au temps de remaniement des adhérences focales. Avec cette technique, il est possible de capturer le comportement de molécules fluorescentes à un instant donné. Cependant, la photodestruction des molécules lentes n'est pas négligeable, ce qui aura tendance à donner des temps de diffusion trop rapides[128].

Temporal Image Correlation Spectroscopy (tICS)

Nous avons vu dans le chapitre précédent que le principe du tICS est très proche de la FCS. Il s'agit d'utiliser les fluctuations temporelles de fluorescence d'un groupe de pixels d'une image pour avoir des informations sur la mobilité des molécules, leur concentration, ainsi que leur fraction immobile. En d'autres termes, cela consiste à observer la corrélation entre deux images (sans décalage spatial). En observant pendant plusieurs minutes un plan de

l'échantillon, il est possible d'accéder à des dynamiques de molécules très lentes ($D < 10^{-2} \mu m^2/sec$). Cette technique est donc adaptée à la diffusion de molécules en milieu très visqueux.

Plusieurs opérations sur les données sont nécessaires. Tout d'abord, on définit les fluctuations spatiotemporelles de fluorescence ($\delta i(x, y, t)$) comme la différence entre l'intensité de fluorescence à chaque pixel (x,y) au temps t et l'intensité moyenne de la zone à analyser au temps t ($\langle i(x, y, t) \rangle_t$), $\langle \rangle_t$ dénote une moyenne spatiale (équation 3.9). L'hypothèse est donc que la zone analysée est homogène en intensité de fluorescence ainsi qu'en comportement dynamique.

$$\delta i(x, y, t) = i(x, y, t) - \langle i(x, y, t) \rangle_t \quad (3.9)$$

Ensuite, on calcule l'amplitude du centre (0,0) de la corrélation temporelle sans décalage spatiale entre deux images séparées d'un temps τ (exemple : $\tau = 1$ entre image 1-2,2-3,3-4,...; $\tau = 2$ entre image 1-3,2-4,...) que l'on moyenne dans toutes les régions d'intérêts de l'image. L'équation décrivant le calcul de la corrélation est donnée ci-dessous[143]. (équation 3.10).

$$G(\tau) = r(0, 0, \tau) = \frac{\langle \delta i(x, y, t) \delta i(x, y, t + \tau) \rangle}{\langle i(x, y, t) \rangle_t \langle i(x, y, t + \tau) \rangle_{t+\tau}} \quad (3.10)$$

Sur des temps courts, les images sont relativement semblables et l'amplitude de la courbe est élevée. Sur des temps longs, les images se ressemblent moins, et la courbe tend vers une valeur représentant la fraction de molécules immobiles et stables dans l'image. L'allure de la courbe peut varier en fonction du type de mobilité observé (diffusion 2D, diffusion 3D, diffusion avec interaction). Les résultats présentés dans ce manuscrit utilisent un modèle de diffusion avec interaction (équation 3.11).

$$g(\tau) = G(\tau) - 1 = \frac{1}{N_{tot}} \left(\alpha_{eq} \left[(1 - F_b^{eq}) g_D(\tau) + F_b^{eq} e^{-k_{off}\tau} \right] + (1 - \alpha_{eq}) \right) \quad (3.11)$$

Nous avons choisi d'utiliser ce modèle en se basant sur les observations faite dans la publication de Rossier & al[116] montrant que $\beta 1$ et $\beta 3$ possèdent trois types de régimes de diffusion (diffusive, confiné, immobile). Ces trois types de régimes peuvent être décrits par l'utilisation de ce modèle. α_{eq} correspond à la fraction des molécules participant aux échanges entre état libre et immobile pendant le temps d'acquisition ($1-\alpha_{eq}$: fraction immobile), F_b^{eq} représente une sous-partie de α_{eq} . Il s'agit de la fraction de molécules à l'équilibre, parmi les molécules participant aux échanges, attachées au substrat. Chacune de ces molécules se renouvelle avec un temps caractéristiques τ_{off} . $g_D(\tau)$ est la fonction décrivant la diffusion des molécules à l'équilibre diffusant librement dans l'échantillon. En pratique, la tICS ne permet pas d'observer la dynamique des molécules diffusant librement, le temps entre les images étant trop important pour observer une corrélation de diffusion. Le temps d'échantillonnage étant de l'ordre de la seconde, toutes les molécules ayant une mobilité supérieur à $10^{-2}\mu m^2/sec$ ne sont pas observables. g_D est donc toujours égal à 0.

L'équation se simplifie donc :

$$g(\tau) = \frac{1}{N_{tot}} \left(\alpha_{eq} F_b^{eq} e^{-k_{off}\tau} + (1 - \alpha_{eq}) \right) \quad (3.12)$$

Trois paramètres peuvent être extraits de la courbe, $g(0)$, $g(\infty)$, ainsi que le temps caractéristiques de décroissance $t_{off} = 1/k_{off}$.

$$g(0) = \frac{\alpha_{eq} F_b^{eq}}{N_{tot}} \quad g(\infty) = \frac{1 - \alpha_{eq}}{N_{tot}} \quad (3.13)$$

On ne peut donc pas, sans hypothèse supplémentaire, estimer les valeurs de N_{tot} , α_{eq} et F_b^{eq} indépendamment.

Le microscope utilisé pour les mesures de tICS est le même que pour le FRAP. Nous avons enregistré 200 images dans un même plan d'une taille 256x256 pixels de 180 nm. L'image est acquise à la vitesse de 300 lignes par seconde, donnant une fréquence d'acquisition d'image de 1,15 images/seconde.

Le programme utilisé a été écrit par notre équipe sur MatLab®(Mathworks,

Natick, MA). Il nous a permis de définir de manière automatique la position de la cellule ainsi que les sous-régions à analyser correspondant chacune à un niveau de force spécifique. La position des adhérences est établie par seuillage d'intensité à partir de l'image moyenne de la cellule pendant le film. Les sous-régions choisies ont été déterminées à partir des mesures de forces de traction. Les régions Rouge et Orange correspondent à des régions où les intégrines sont connectées à des fibres d'actines se trouvant au-dessus d'un bord adhésif. A contrario, les régions Magenta et Bleu correspondent aux intégrines connectées à des fibres d'actines au-dessus d'un bord non-adhésif (Figure 3.4).

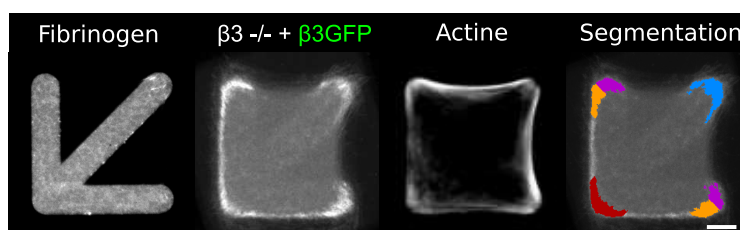


FIGURE 3.4: **Segmentation des différentes régions en fonction des niveaux de tensions.** Le code couleur est choisie en fonction de la tension dans chaque région, liée au nombre de bord adhérent ou non-adhérent. Le rouge correspond à une région liée à deux bords adhérents, la zone orange à un bord adhérent, la zone magenta à un bord non-adhérent, la zone bleue à deux bords non-adhérent. Barre d'échelle $5\mu\text{m}$

Parmi l'ensemble des courbes de corrélation calculées pour chaque région, certaines sont éliminées pour les raisons suivantes :

- surface des plaques d'adhérence jugée trop faible (moins de 30 pixels, zone rouge figure 3.5.A) ;
- mouvement de la platine de translation (image moyenne floue) ;
- photoblanchiment important et mal corrigé (Figure 3.5.B) ;
- mauvais ajustement de la courbe de corrélation (Figure 3.5.C) ;
- variation forte d'intensité au cours du temps, dû à des problèmes de détection de photons (Figure 3.5.D) ;

Dans des cas où la courbe s'ajuste de manière correcte sur les premiers points puis diverge, les données sont d'abord mise de côté. Si la valeur ob-

tenue est comprise dans la gaussienne des données jugées "propre", la valeur est conservée. Cette différence entre la courbe d'ajustement et la courbe de corrélation au temps longs peut s'expliquer par le manque de statistique au temps long ne donnant pas un résultat fiable dans cette gamme temporelle.

Dans des cas où la mesure du temps de résidence en plaque est inférieure au temps de résidence hors plaques, la valeur est également supprimée.

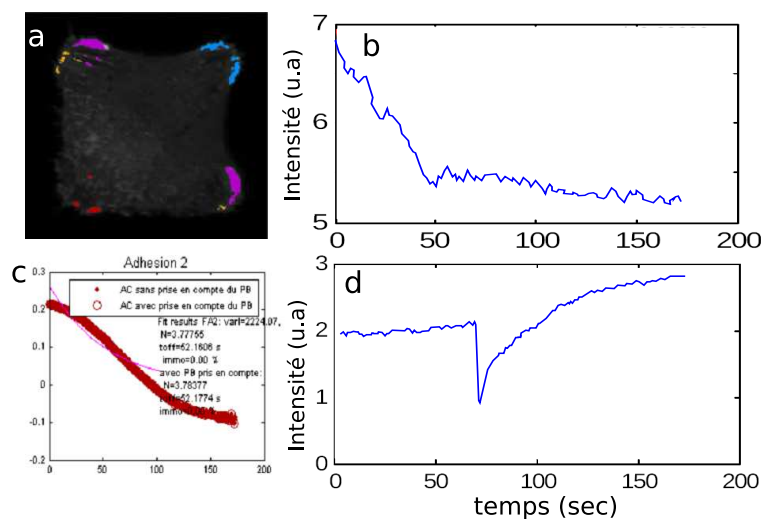


FIGURE 3.5: **Paramètre de tri des données de TICS.** Les courbes de TICS peuvent être supprimées pour plusieurs raisons. a. Région d'analyse trop petite. b. Photoblanchiment important. c. Courbe mal ajustée. d. Saut d'intensité au cours du temps dans la région analysée.

Sur environ 100 cellules enregistrées par phénotype, une cinquantaine sont conservées pour l'analyse statistique.

Raster-Scan Image Correlation Spectroscopy

Comme exposé dans le chapitre précédent, le RICS se base sur la corrélation de fluorescence dans une imagerie de type confocal entre un pixel et ces proches voisins. En faisant un sur-échantillonnage de l'image, ainsi qu'en adaptant la vitesse de balayage à la mobilité des molécules observées, il est possible d'estimer la vitesse de déplacement de molécules fluorescentes ainsi que leur nombre dans un échantillon vivant. Il est typiquement nécessaire

d'acquérir une centaine d'images pour avoir une bonne statistique[17].

Comme en FCS, l'auto-corrélation du signal de fluorescence permet d'avoir une information sur la dynamique des molécules. La différence vient du fait que le signal acquis correspond à une fluctuation spatiale et temporelle de la fluorescence. Il est cependant possible d'extraire des informations sur la dynamique des molécules fluorescentes "cachées" dans l'auto-corrélation spatiale du signal (équation 3.14).

$$G_{RICS}(\Delta x, \Delta y) = \frac{\langle F(x, y)F(x + \Delta x, y + \Delta y) \rangle}{\langle F(x, y) \rangle^2} \quad (3.14)$$

Pour définir les zones correspondant aux régions plaques/hors plaques, nous utilisons un simple seuillage d'intensité. Le calcul d'auto-corrélation se faisant généralement sur des zones rectangulaires, nous segmentons l'image en délimitant le plus petit rectangle englobant la plaque à analyser. Les pixels ajoutés autour de la plaque segmentée pour compléter ce rectangle ont comme valeur l'intensité moyenne de la plaque (Figure 3.6). Des expériences témoins sur des solutions nous ont permis de conclure que si la zone segmentée est plus grande que la taille de l'auto-corrélation, les pixels ajoutés n'auront pas d'impact dans le calcul de l'auto-corrélation.

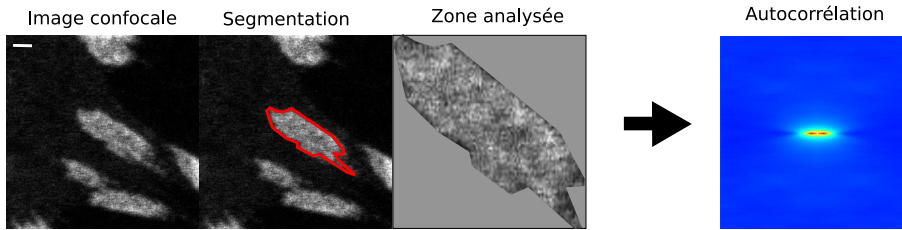


FIGURE 3.6: Définition d'une zone d'analyse en RICS La région d'intérêt est tout d'abord définie par un seuillage d'intensité, puis délimitée en l'englobant dans le plus petit rectangle possible. Les pixels rajoutés sont ensuite remis à niveau en se basant sur l'intensité moyenne de la région d'intérêt. Barre d'échelle = 500nm.

Il est important de noter que le calcul de la corrélation se fait sur les fluctuations spatiales d'intensité, il est donc nécessaire de supprimer sur chaque image la valeur moyenne d'intensité correspondant aux structures immobiles,

pour n'observer que les fluctuations de signal dues au déplacement des molécules.

Il est ensuite possible d'ajuster la fonction d'auto-corrélation 3.14, en la décomposant en deux fonctions G et S : G étant la partie due à la diffusion des molécules dans l'image, S la partie due au balayage du point d'observation, dépendant de la diffusion des molécules dans l'échantillon (équation 3.15).

$$G_{Fit}(\Delta x, \Delta y) = S(\Delta x, \Delta y) \times G(\Delta x, \Delta y) \quad (3.15)$$

$$S(\Delta x, \Delta y) = \exp \left(-\frac{\left(\frac{\Delta x \delta_r}{\omega_r}\right)^2 + \left(\frac{\Delta y \delta_r}{\omega_r}\right)^2}{1 + \frac{4D(\delta_{tp}\Delta x + \delta_{tl}\Delta y)}{\omega_r^2}} \right) \quad (3.16)$$

$$G(\Delta x, \Delta y) = \left(1 + \frac{4D(\delta_{tp}\Delta x + \delta_{tl}\Delta y)}{\omega_r^2}\right)^{-1} \times \left(1 + \frac{4D(\delta_{tp}\Delta x + \delta_{tl}\Delta y)}{\omega_z^2}\right)^{-1/2} \quad (3.17)$$

Dans les équations 3.15 à 3.17, Δx et Δy correspondent au décalage spatial en nombre de pixel, δ_r est la taille du pixel (dans la même unité que le rayon ω_r du volume d'observation), plus petit que la PSF du système d'imagerie, due au sur-échantillonnage, δ_{tp} et δ_{tl} correspondent respectivement aux temps entre un pixel et son voisin sur la même ligne (temps court), ou sur la même colonne (temps long). La troisième équation 3.17 correspond à la diffusion en 3D des molécules. Il est possible dans le cas de l'étude de molécules transmembranaires de simplifier cette partie de l'équation, en supposant que la molécule n'est capable de migrer que dans le plan d'observation et en fixant ω_z à ∞ (ce qui revient à bloquer à 1 la valeur du terme longitudinal).

Les expériences de RICS ont été réalisées sur la plateforme d'imagerie de l'IAB⁶ sur un microscope confocal ZEISS LSM710 équipé d'un laser Argon et d'un objectif apochromatique x40/1,2 à eau ainsi qu'un détecteur de type APD. Les paramètres d'acquisitions utilisées durant cette thèse sont les suivants. Les images acquises sont des piles de 100 images d'une taille de

6. Institut Albert Bonniot

256x256 pixels, avec comme paramètres $\delta r = 42nm$, $\delta_{tp} = 50\mu s$, $\delta_{tl} = 30ms$, paramètres que nous avons jugé optimaux pour avoir une bonne statistique sur la diffusion de protéine transmembranaires tel que les intégrines.

Le programme d'analyse a été écrit au laboratoire pour pouvoir adapter l'analyse à nos films. Un programme d'analyse a été écrit par Enrico Gratton et est disponible sur internet (simFCS : <http://www.lfd.uci.edu/globals/>). Cependant, il oblige l'analyse d'une sous-région carrée, faisant la supposition que le comportement des molécules dans le carré est homogène. De plus, la suppression des structures immobiles se fait via la soustraction de l'image moyennée sur 10images autour de l'image analysée. Notre version du programme propose d'utiliser le fait que seules les structures immobiles seront corrélées entre une image et l'image successive et peuvent donc être supprimer via la cross-corrélation. Cette modification permet d'analyser de manière plus précise les structures se déplaçant rapidement entre les images. Il a été écrit sur le logiciel MatLab®(Mathworks, Natick, MA).

3.3 Quantification d'images et mesures de forces

3.3.1 La microscopie à force de traction (TFM)

La microscopie à force de traction est utilisée pour connaître l'énergie contractile que la cellule applique sur un substrat mou. En incluant des billes fluorescentes dans un gel élastique continu de polyacrylamide, il est possible de voir le déplacement des billes fluorescentes lors de l'adhérence de la cellule. Il est également possible de combiner la microscopie à force de traction avec la microfabrication de motif de protéine de matrice extra-cellulaire, et d'analyser le déplacement des billes sous le motif.

Une expérience de TFM se passe en 4 étapes. 1) Les cellules adhèrent sur le substrat et exercent des forces. 2) Nous prenons des images des billes sous le motif par microscopie confocale. 3) Nous détachons les cellules par ajout de trypsine pour relaxer le gel. 4) Nous revenons sur les positions des cellules pour prendre des images des billes quand le gel est au repos, et on les compare aux images des billes quand le gel est dit "stressé". Avec notre technique de fabrication, les billes sous le motif semblent plus brillante que celles hors motif. Les images étant faites sur un microscope confocal, nous expliquons cela par le nano-relief créé au moment de la conception des gels par la brosse de NIPAM. Les billes hors motif sont donc en dehors du plan de focalisation du microscope, et apparaissent ainsi beaucoup moins intense.

La détection des déplacements de billes est une étape cruciale pour l'obtention de données propres et exploitables. Suite à cela, nous utilisons deux techniques de détection permettant d'augmenter la précision des déplacement mesurés, la PIV⁷, et la SPT.

Le principe de la PIV est de découper l'image des billes en sous-fenêtres, sur lesquelles on effectue un calcul de corrélation, entre l'image stressée et au repos. Le déplacement moyen pour chaque fenêtre est calculé à partir de la valeur maximale de corrélation, permettant de corriger le drift possible entre les 2 images. Seuls les déplacements dû à la déformation du gel par la

7. Particle Image Velocymetry

cellule subsistent. On effectue ensuite une analyse fine par SPT, permettant de connaître le déplacement de chaque bille dans l'image avec une résolution de 100nm, et de construire une image du champ de déplacement des billes sous la cellule.

La déformation du substrat n'est pas ponctuelle mais propagée sur la surface. Ainsi, la formule classique de Hooke faisant la relation entre une force et un déplacement n'est pas utilisable. Dans le cas 2D, nous utilisons l'équation reliant le champ de déplacement \vec{U}_{ij} à la convolution entre le champ de traction \vec{T}_{ij} et le tenseur de Green G_{ij} , une matrice représentant les propriétés visco-élastique du matériel (Formule 3.18).

$$\vec{U}_{ij}(r) = \int \int G_{ij}(r - r') \vec{T}_{ij}(r') dr' \quad (3.18)$$

Nous supposons que le substrat est incompressible, permettant de déduire le coefficient de Poisson, rendant possible la résolution de la fonction de Green[37] (équation 3.19).

$$G_{ij}(r) = \frac{1 + \nu}{\pi E r^3} \begin{bmatrix} (1 - \nu)r^2 + \nu x^2 & \nu xy \\ \nu xy & (1 - \nu)r^2 + \nu y^2 \end{bmatrix} \quad (3.19)$$

E représente ici le module d'Young du substrat, et ν le coefficient de Poisson considéré, ici 0,5.

Le champ de déplacement est déduit par le déplacement des billes. La matrice utilisée pour le tenseur de Green est connue grâce aux hypothèses faite. Pour connaître le champ de traction, il suffit donc d'inverser la matrice G. Or, la matrice n'étant pas diagonale, le temps de calcul pour résoudre l'équation pour chaque vecteur déplacement est longue. Une solution est de se placer dans l'espace de Fourier et d'utiliser la méthode appelée Fourier Transform Traction Cytometry (FTTC). Dans l'espace fréquentiel, le produit de convolution devient un produit simple[21]. De plus, la matrice du tenseur de Green devient diagonale dans l'espace de Fourier. La résolution du problème est ainsi largement simplifiée. Il est ensuite possible de se replacer dans l'espace réel une fois le champ de traction calculé, par la transformée

de Fourier inverse.

3.3.2 Quantification de la distribution des adhésions

Durant ma thèse, j'ai eu l'opportunité de travailler en collaboration avec une autre doctorante de l'équipe (Rachel MILLOUD) sur le sujet de la redistribution des adhésions focales en cas de déficience en intégrines. Pour ce projet, j'ai écrit un programme d'analyse d'images d'immunofluorescences permettant de quantifier de manière automatique la position et composition des adhésions cellulaires par rapport à la membrane, pour mettre en valeur les différences de distribution entre plusieurs phénotypes.

La première étape de l'analyse consiste à trouver la position de la cellule dans l'image. En traçant l'histogramme des intensités dans l'image, il est possible de séparer les pixels provenant du fond de l'image des pixels de la cellule, le fond correspondant au premier pic de l'histogramme d'intensité. Par seuillage, il est ainsi possible de créer un masque binaire permettant de situer la position de la cellule, et de construire une image correspondant au contour de la cellule. Il est également possible d'analyser la position de la membrane sur un film, et observer la variation de l'aire de la cellule dans le temps par exemple, ou d'effectuer une statistique sur plusieurs cellules.

La seconde étape consiste à identifier les structures correspondant à des adhésions focales. Cette étape de segmentation peut énormément faire varier les résultats finaux. Les intensités sont tout d'abord corrigées en fonction du type de marquage : par anti-corps (normalisation par le signal à l'intérieur de la cellule), ou par l'expression de protéine fluorescente par la cellule (normalisation par le bruit à l'extérieur de la cellule). Les adhésions sont ensuite segmentées par niveau d'intensité.

La troisième étape correspond à l'analyse de la distance entre le centroïde de chaque adhésions détectées par rapport à tous les pixels de la membrane. La distance à la membrane, la forme, l'aire, et l'intensité de chaque adhésions est ensuite répertoriées dans un tableau pour analyse statistique (Figure 3.7).

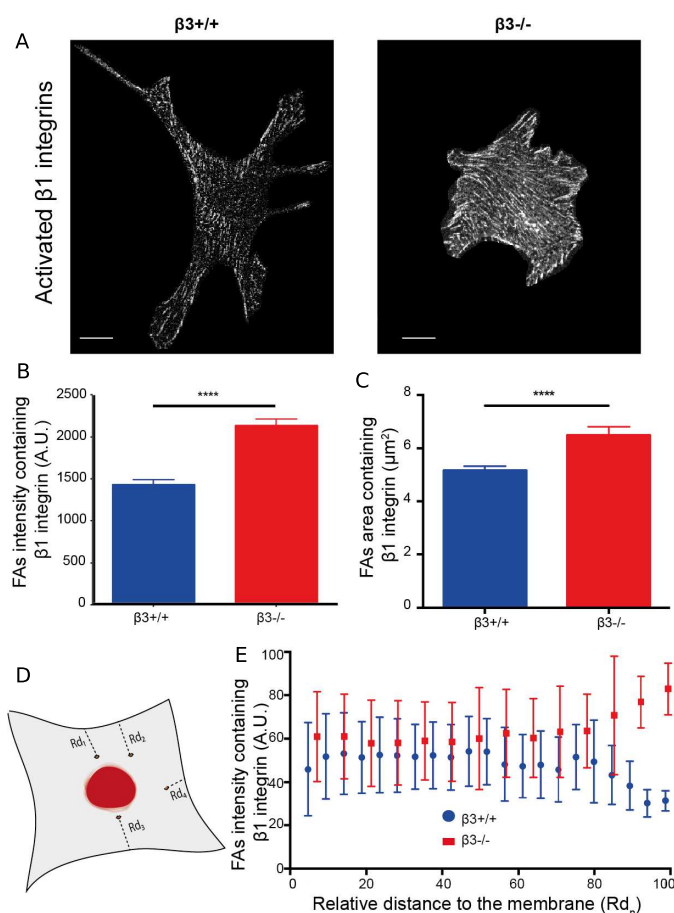


FIGURE 3.7: **Etude de la distribution des adhérences $\beta 1$** [93]. A. Image de la distribution des adhérences $\beta 1$ selon la présence ou non de $\beta 3$ B. L'étude de la distribution du signal de $\beta 1$ nous montre une augmentation significative du signal de fluorescence. C. l'étude de la localisation des adhérences nous montre que la différence se fait sur les adhérences localisées au centre de la cellule.

Ce programme a été utilisé notamment dans ce papier[24] publié en 2015, illustrant l'effet de l'oestrogène sur le renforcement des adhérences focales, via l'analyse de l'intensité de la vinculine entre des cellules vivants en présence ou en absence de cette hormone.

3.4 Biologie cellulaire et manipulation

3.4.1 Culture cellulaire

Le type cellulaire que nous avons choisi pour cette étude sont des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF). Les MEFs sont responsables de la réorganisation de la matrice extracellulaire. Elles adhèrent très bien sur la fibronectine, et exercent des forces de traction quantifiable sur gel de polyacrylamide.

Les MEF $\beta 1^{-/-}$ sont le généreux don du professeur Reinhard Fässler (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsreid, Germany). Les MEF $\beta 3^{-/-}$ proviennent d'un don généreux du Dr. Richard Hynes (The David H. Koch Institute for Integrative Cancer Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA). La restauration de l'expression de l'intégrine rendue fluorescente a été possible grâce aux dons du Dr. Humphries (University of Manchester, England, par infection rétroviral avec pFB-Neo-human $\beta 1$ -GFP) et du Dr. Wehrle-Haller (University of Geneva, Switzerland, par vecteur pBabe-mouse $\beta 3$ -GFP). Cette approche de génétique reverse a été utilisée afin d'avoir un taux d'expression de la protéine fusionné à la GFP comparable à la protéine normale et de pouvoir observer la dynamique de toutes les intégrines modifiées. Les infections ont été effectuées par le Dr Olivier DESTAING (Institut Albert Bonniot, Grenoble, France).

Elles ont été cultivées à 37°C, 5% de CO₂ dans du DMEM⁸ High-Glucose supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal acheté chez Sigma-Aldrich, 100 unités/ml de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine. Une fois la boîte de pétri à confluence les cellules sont détachées à l'aide de trypsine 1X supplémenté en EDTA 0.05% (v/v). Une fois détachée, les cellules sont collectées et centrifugées à 250G pendant 3 minutes pour séparer les cellules du milieu, et ainsi ôter la trypsine. Elles sont ensuite re-suspendues, puis comptées grâce à une cellule de Malassez et enfin remises en culture à une concentration d'environ 50 000 cellules pour des boîtes de 10cm de diamètre. Les MEF

8. Dulbecco's Modified Eagle's Medium

modifiées et utilisées durant cette thèse sont conservées environ 15 passages au maximum, les cellules perdant de leur fluorescence après chaque passage.

Le milieu d'observation utilisé lors de l'imagerie est une version modifiée du DMEM utilisée en culture dans lequel le rouge de phénol et le pyruvate autofluorescent ont été enlevés de la formulation. Le sodium bicarbonate a également été supprimé, puis remplacé par du NaCl pour garder la même osmolarité. Nous avons ajouté par la suite 10% de sérum de veau foetal, ainsi que 10mM d'HEPES pour tamponner le milieu dû à l'absence de régulation de CO₂ sur le microscope. Avec ce milieu, les cellules sont capables de survivre plus de 8h sur le microscope.

3.4.2 Tri cellulaire

La cytométrie en flux (FACS) est une technique permettant de compter et trier les cellules en fonction de plusieurs caractéristiques de tailles ou d'intensité de fluorescences. Pour cela, les cellules sont analysées une à une par un faisceau laser et se trouvent dans un milieu chargé. En observant l'intensité de fluorescence ré-émise par la goutte, ou la diffraction de la lumière, il est possible d'identifier les paramètres morphologiques des cellules, ainsi que leur taux d'expression de protéines fluorescentes. L'utilisateur fait ensuite le choix de sélectionner ou non la goutte de cellule, qui sera ensuite chargée puis déviée via un chargeur qui permet de ioniser la goutte cellulaire. Il est possible enfin d'appliquer un courant sur des plaques de déviation, qui va modifier le trajet de la goutte pour concentrer les cellules d'intérêt, et éliminer les autres (Figure 3.8).

Dans notre cas, le tri a été effectué selon 2 critères : 1) l'intensité de fluorescence de la GFP fusionnée à l'intégrine d'intérêt. 2) le taux d'intégrine se trouvant à la membrane plasmique.

Pour cela, nous avons mis en contact nos cellules infectées exprimant l'intégrine-GFP cytosolique avec un anticorps anti- $\beta 3$ ou anti- $\beta 1$ provenant d'un rat puis un anticorps secondaire anti-rat fusionné à un fluorophore Alexa647. La différence du marquage vient du fait que la réaction avec cet

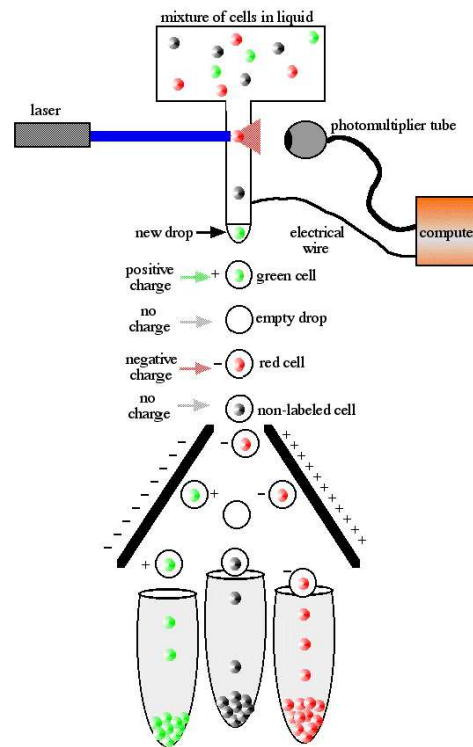


FIGURE 3.8: **Tri cellulaire par intensité du signal de fluorescence.** Image typique d'un trieur de cellule. Les gouttes contenant les cellules une fois analysées par un faisceau laser sont chargées pour être séparées selon plusieurs critères de formes ou d'intensité. Image extraite de <http://bio.davidson.edu>

anticorps se fait à 4°C, empêchant la cellule d'endocyter l'anticorps puis le fluorophore. Ainsi, le signal provenant de l'Alexa647 correspond à un marquage de surface de l'intégrine. Il est donc possible par cette astuce de sélectionner les cellules exprimant un taux d'intégrine à la surface comparable aux cellules WT⁹, et ne pas sélectionner ainsi les cellules non infectées, exprimant trop l'intégrine ou les cellules exprimant la GFP libre dans le cytoplasme. Les cellules sélectionnées seront ensuite amplifiées puis congelées pour utiliser la même souche cellulaire durant toute la thèse.

9. Wild-type : sauvage

3.4.3 Congélation

Pour ne pas avoir à répéter les étapes d'infection et de tri, les cellules ont été aliquotées et congelées à -80°C . Pour éviter la destruction de la cellule due à la formation de cristaux de glace dans la solution, les cellules ont été congelées dans un milieu adapté de 2-3ml constitué de 50% de DMEM contenant environ 100 000 cellules, 30% de sérum, et 20% de DMSO servant ici de cryoprotecteur.

3.4.4 Immunomarquage

Pour la visualisation des différentes protéines, les cellules ont été fixées pendant 10min, 4h après adhésion avec une solution de PFA¹⁰ à 4% (poids/volume) ayant comme effet de figer les cellules dans leur état. Elles ont ensuite été perméabilisées en utilisant une solution de PBS sans calcium et magnésium contenant 0.1% Triton et 4% de BSA¹¹ qui viendra se fixer sur les sites d'interactions non spécifique, et ainsi diminuer le bruit dans nos images. Les protéines ciblées ont finalement été marquées en utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte, qui permet d'avoir une intensité de marquage plus forte que l'immunofluorescence directe. Dans ce cas, on utilise un anticorps primaire venant se lier spécifiquement à la protéine d'intérêt. On utilise ensuite un anticorps secondaire polyclonal couplé à un fluorophore ayant une haute affinité pour l'anticorps primaire. Les couples d'anticorps utilisées sont inscrits dans le tableau ci-contre (Tableau 3.1)

10. Paraformaldehyde

11. Bovine serum albumin

12. Myosin Light Chain

Anticorps	Type	Origine	Fournisseur
Anticorps Primaires			
Taline 8D4	monoclonal	Souris	Sigma T3287
Kindline-2	monoclonal	Lapin	Sigma K3269
Vinculine 11-3	monoclonal	Souris	Sigma V6630
Phospho-MLC ¹²	polyclonal	Lapin	Cell Signaling 3674
Phospho-paxilline PY118	monoclonal	Lapin	Invitrogen 44722G
Phospho-tyrosine 4G10	monoclonal	Souris	Millipore 05321
Anticorps Secondaires			
Souris-Alexa488	polyclonal	Chèvre	LifeTechnology A-11001
Lapin-Alexa647	polyclonal	Chèvre	LifeTechnology A-21245
Marqueur fluorescent			
Phalloïdine-Tritc			LifeTechnology P1951
Phalloïdine-Atto647N			Sigma 65906

TABLE 3.1: **Anticorps et marqueurs utilisés.** Listes des différents anticorps primaires et secondaires utilisés pendant cette thèse.

Chapitre 4

Résultats expérimentaux

4.1 Géométrie pour contrôler la distribution des forces

La démarche méthodologique centrale à ce travail est d'utiliser des micromotifs de matrices extra-cellulaires pour contrôler la forme, la surface d'étalement des cellules, ainsi que la distribution des forces exercées[90]. Cela permet également d'empêcher la migration des cellules ainsi que la déformation des adhérences focales, facilitant ainsi l'analyse des films. Les premières expériences ont donc consisté à adapter la taille des motifs à la surface d'adhérence des cellules MEF. Pour cela, nous avons laissé adhérer les cellules pendant 4h sur une lamelle de verre recouvert de fibronectine. Les cellules ont ensuite été fixées puis observées au microscope à contraste de phase pour accentuer les contours de la cellule et avoir une meilleure estimation de leurs surfaces (Figure 4.1).

La surface moyenne des cellules est estimée en se plaçant au centre de la gaussienne des distributions des surfaces, c'est à dire $1072\mu m^2$. Souhaitant obtenir des cellules de formes carrées, la surface des motifs choisie a été de $32 \times 32\mu m$, donnant une surface projetée de $1024\mu m^2$.

Pour contrôler la forme de la cellule, il suffit de créer un contraste adhésif entre la partie non adhésive du substrat, dans notre cas une brosse de

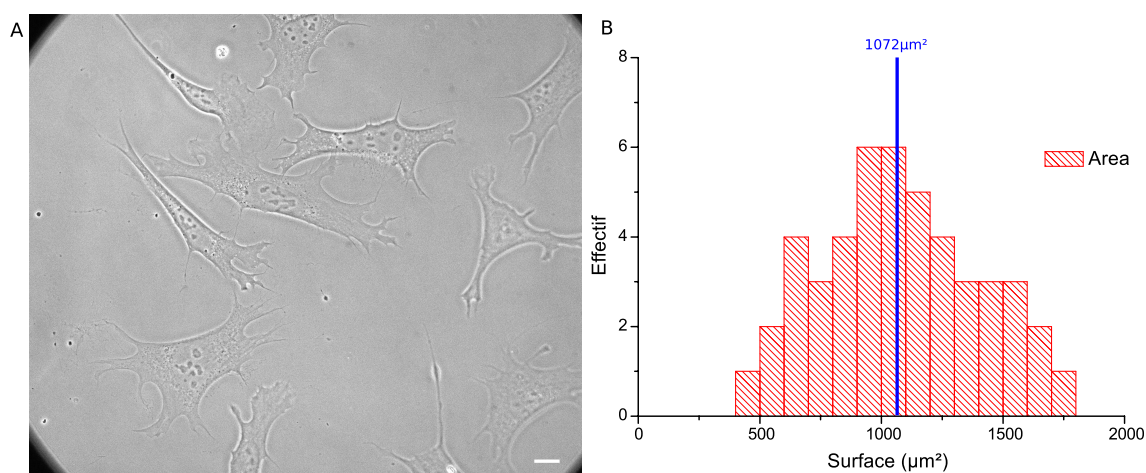


FIGURE 4.1: **La surface moyenne des cellules MEFs sur verre homogène est estimée à $1072\mu\text{m}^2$.** A. Image typique de cellules MEF adhérant sur une surface de verre recouverte de fibronectines prise au microscope à contraste de phase. B. L’histogramme des surfaces d’étalement des cellules MEF. La surface utilisée pour les motifs a été estimée en calculant la surface carrée la plus proche du centre de la gaussienne, c’est à dire $1024\mu\text{m}^2$. Barre d’échelle sur l’image= $5\mu\text{m}$.

P-NIPAM, et la partie adhésive composée de protéines de la matrice, dans notre cas de la fibronectine, mélangée parfois avec du fibrinogène fluorescent pour visualiser le motif. Le protocole de greffage du NIPAM sur une lame de verre est conforme au protocole attaché en annexe. Il est possible de contrôler à la fois la densité de greffage du polymères ainsi que la hauteur de la brosse en jouant sur le temps de réaction lors des différentes étapes (Figure 4.2). Souhaitant vérifier quels étaient les hauteurs minimales et maximales nécessaires pour contrôler l’adhérence cellulaire, nous avons utilisé une technique appelée ellipsométrie pour définir l’épaisseur de la brosse.

Nous avons testé, en utilisant des substrats contenant une brosse distribuée de manière homogène sur la surface, la hauteur minimale de la brosse nécessaire pour empêcher l’adhérence cellulaire. Il apparaît qu’une brosse de 10nm soit suffisante pour empêcher la cellule de s’attacher à la lamelle.

La vitesse de croissance de la brosse varie en fonction du temps pour tendre vers une épaisseur maximale d’environ de 200nm. Il apparaît dans

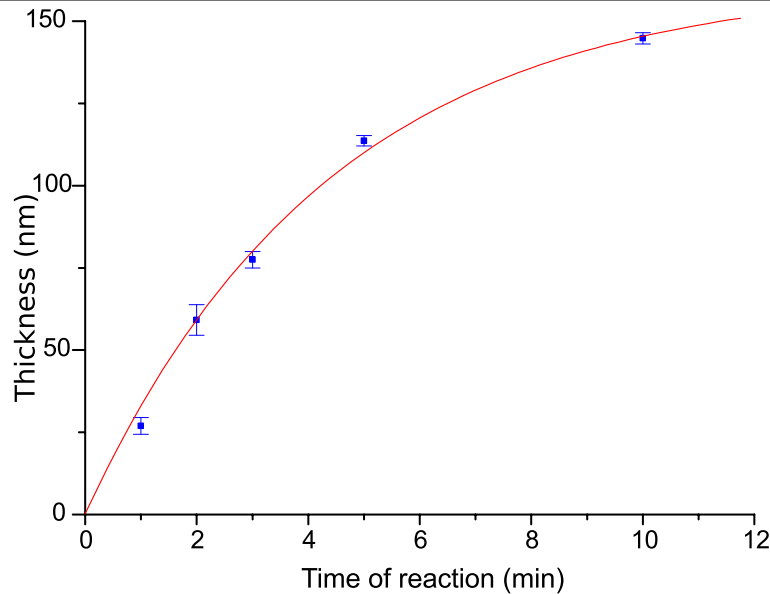


FIGURE 4.2: **Courbe de la croissance exponentielle inverse de la taille de la brosse en fonction du temps de réaction.** La courbe de croissance suit une croissance exponentielle inverse jusqu'à un plateau aux environs de 200nm. La taille de la brosse utilisée dans les prochaines expériences a été de 60nm.

nos tests qu'une telle épaisseur de brosse n'a pas d'impact sur la capacité des cellules à adhérer sur des motifs adhésifs, la cellule étant toujours capable de produire des extensions assez grande pour adhérer à la surface. Toutes les expériences réalisées sur motifs sur verre dans cette thèse l'ont été avec une brosse d'environ 60nm.

Suite à cela, nous nous sommes intéressés à la forme du motif adhésif. **Quel motif adhésif permet de contrôler et moduler la distribution des forces de traction pour obtenir un différentiel significatif entre différentes régions d'intérêt au sein de la même cellule ?**

Plusieurs formes ont été testées, allant de la flèche au H, motif homogène ou discontinu. Les forces s'exerçant via les fibres d'actines grâce à la myosine, nous avons eu l'idée de créer au sein de la cellule un différentiel de concentration en fibres acto-myosines contractiles dans certaines régions pour induire un différentiel de force de traction. Dans tout ces motifs, il était

possible de comparer différentes régions de la cellule ayant des niveaux de forces théoriquement différents dû à l'organisation de leur cytosquelette.

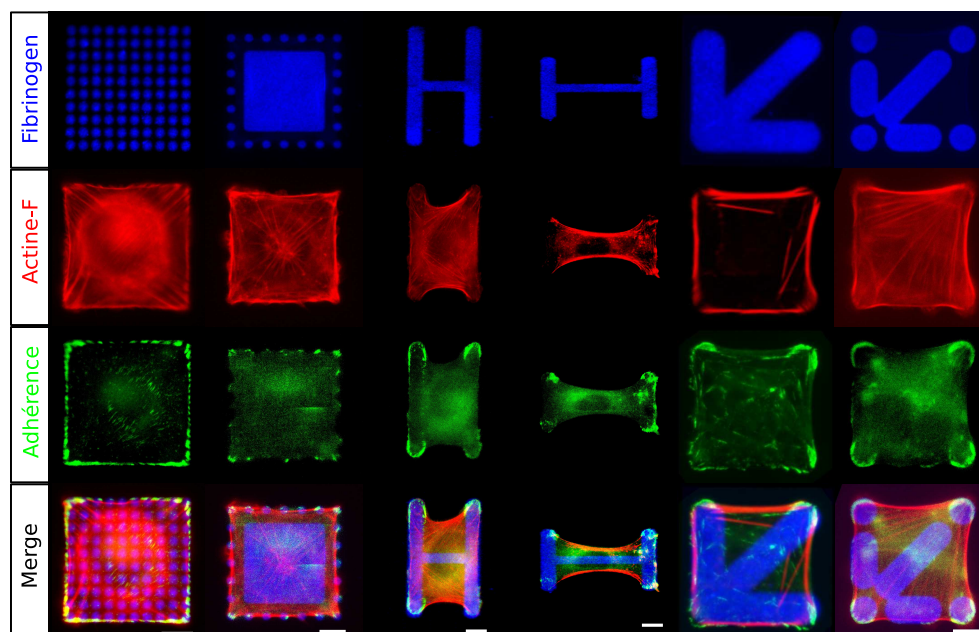


FIGURE 4.3: **Les motifs permettent de contrôler la distribution des forces de traction cellulaires.** Localisation de quelques acteurs de la mécanotransduction par immunomarquage. Le motif d'adhérence est visualisé en utilisant un mélange de fibronectine/fibrinogène fluorescent. Le polymère d'actine est rendu fluorescent grâce à la phallo idine fluorescente. Les adhérences visualisées correspondent aux intégrines $\beta 3$ -GFP dans des cellules MEFs $\beta 3^{-/-}$ pour les motifs en point et les H. Les plaques d'adhérence sur flèche sont visualisées par immunomarquage de la paxilline. Barre d'échelle, $8\mu\text{m}$.

Le motif discontinu nous permet de comparer trois zones ayant des niveaux de tensions différentes : les points situés dans les coins (force maximale), les points sur les bords (force intermédiaire) et les points au centre de la cellule (force minimale) (Figure 4.3 colonne 1 et 2). Le motif de la colonne 2 a été dessiné pour augmenter la surface totale d'adhérence de la cellule et faciliter l'adhérence de la cellule au motif[29]. Cependant, l'expérience montre que la distribution des adhérences focales avec ces motifs ne permettent pas d'étudier des intégrines localisés dans des régions avec des niveaux de forces

de traction différentes. Les adhérences au centre sont quasi-inexistantes, et les adhérences sur les bords de la cellule sont très irrégulières. Avec le motif en H (Figure 4.3 colonne 3 et 4), il est possible de comparer les adhérences se trouvant sur les barres horizontales et verticales. Il serait également possible, en jouant sur le rapport d'aspect du motif, de modifier la longueur des fibres de stress et donc sur sa courbure, paramètre permettant de déterminer la tension de la fibre et donc des forces cellulaires mise en jeu[129]. Cependant, l'exemple montre que les adhérences sont très peu présentes sur la barre horizontale et la comparaison entre deux motifs différents impose également la comparaison entre deux cellules différentes, réintroduisant la notion de variabilité intercellulaire dans nos expériences. Souhaitant comparer des intégrines au sein de la même cellule soumise à des niveaux de forces de traction différentes, nous avons choisi d'utiliser le motif en flèche permettant de moduler au sein de la même cellule la distribution des forces (Figure 4.3 colonne 5 et 6). Ce motif nous permet de comparer les quatre coins du carré, zones très concentrées en adhérences focales. De plus, la géométrie du motif adhésif induit une concentration des fibres d'acto-myosine au dessus des zones non adhésives, résultant en une variation du niveau de force entre le coin inférieur gauche (entouré de deux bords adhésifs) et le coin supérieur droit (entouré de deux bords non adhésifs). Le motif en flèche ponctué a été dessiné ainsi pour délimiter plus facilement les quatre coins de la cellule. L'expérience montre cependant une tendance des cellules à rester sur les barres intérieures, et à ne pas s'étaler jusqu'aux extrémités des motifs, rendant les mesures difficiles. Une fois le motif en flèche choisi, nous avons voulu vérifier par TFM si la variation du niveau de force exercée par la cellule sur le motif en flèche était significativement différente entre les différents coins de la cellule.

4.1.1 Modulation du niveau de contraintes sur un motif en flèche sur gel

Pour quantifier la distribution des contraintes que des cellules MEFs appliquent sur le substrat, nous avons effectué des mesures de forces de traction

sur gel mou de 5kPa.

Les mesures de forces ont été effectuées sur vingt cellules avec le micro-motif en forme de flèche, puis les cartes de forces ont été superposées les unes aux autres en utilisant le motif de fibronectine comme référence. Les contraintes ont ensuite été intégrées sur une surface constante dans les quatre coins et identifiées par un code couleur (Figure 4.4).

Une analyse statistique des résultats montre que le coin inférieur gauche, zone entourée de deux bords adhésifs, a le niveau de force le plus faible (Rouge). Le coin supérieur droit (Bleu) entouré de deux bords non adhésifs a le niveau de force le plus élevé et est significativement différent du coin inférieur gauche. Les zones intermédiaires (Vertes) entourées d'un bord adhésif et d'un bord non-adhésif ont un niveau de tension intermédiaire et ne sont pas significativement différent des autres coins, du fait de leur hétérogénéité en terme de composition de fibre d'actine. Le manque de résolution des expériences de TFM ne permet cependant pas d'analyser plus finement les coins intermédiaires en considérant deux sous-régions proches, une donnant sur un bord adhésif, l'autre sur un bord non-adhésif. Nous verrons que la technique tICS nous a permis de distinguer des dynamiques différentes dans ces sous-régions.

Nous avons ainsi prouvé qu'en disposant des cellules sur des gels mous (5kPa) comportant des micromotifs de matrice extra-cellulaire, il était possible de contrôler la distribution des niveaux de forces et ainsi d'obtenir des différences significatives au sein de la même cellule. Notre idée de départ a été d'effectuer les mesures de mobilité et de forces de traction en utilisant les gels de polyacrylamide. Un problème vient du fait que les intégrines $\beta 3$ -GFP dans les adhérences focales sont peu visibles sur gel mou. Or, étant intéressé par la dynamique des intégrines au sein des adhérences focales, il nous a fallu utiliser des substrats en verre.

Comme il est impossible de faire de mesure de force sur verre, nous avons effectué des marquages comparatifs pour étudier la distribution des acteurs de l'acto-adhérence mécanosensible sur verre et sur gel. Notre hypothèse est

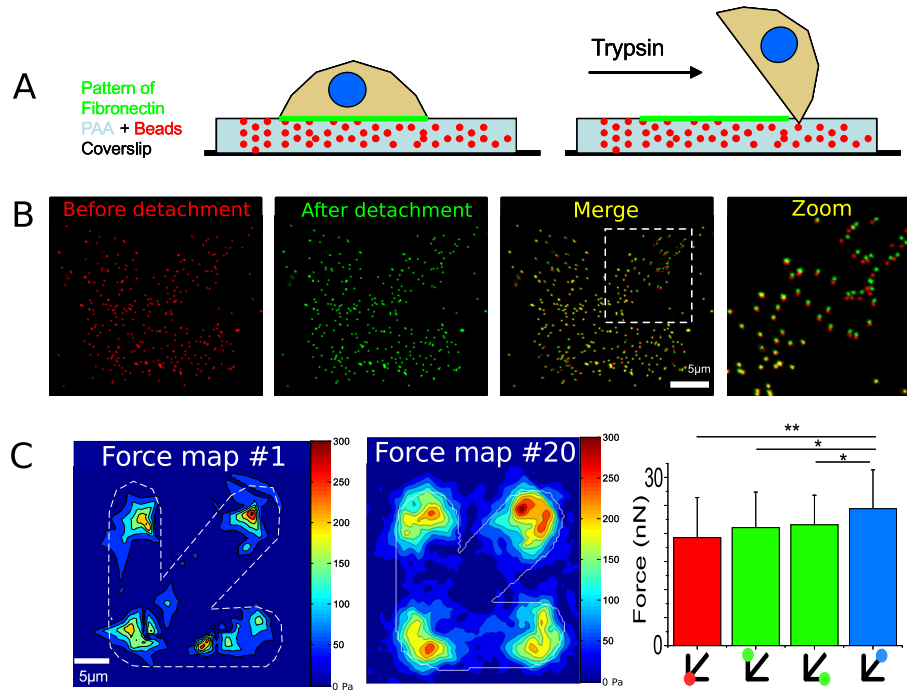


FIGURE 4.4: Les mesures de TFM confirment que le motif en flèche permet d'obtenir des différences significatives de forces de tractions dans les différentes régions d'intérêt. A. Schéma du principe de mesure de forces appliquées au substrat par TFM. La cellule adhère sur un gel de polyacrylamide contenant des billes. La cellule est ensuite détachée par ajout de trypsin, permettant d'obtenir une image des billes quand le gel n'est pas déformé par la cellule. B. Images de billes acquises en présence/absence de la cellule. La superposition des deux images permet de voir le déplacement des billes dû à la cellule. C. Résultats de l'analyse de TFM pour une cellule, la moyenne pour 20 cellules. Le graphique de droite représente la valeur moyenne et l'écart-type des forces intégré sur une région d'intérêt de $7\mu\text{m}$ de diamètre dans chaque coin de la cellule. On observe une augmentation significative de la force dans le coin supérieur droit entouré de deux bords non-adhésifs.

que si la distribution des différentes protéines mécanosensibles importantes dans la génération des forces montrent un profil similaire sur gel et sur verre, la distribution des forces sera la même sur verre que sur gel.

4.1.2 Distribution des acteurs de l'acto-adhésion

Pour pouvoir justifier l'existence d'une modulation des contraintes sur verre, nous avons eu l'idée de comparer la distribution de différents protéines mécanosensibles sur verre et sur gel dans des cellules MEFs. Les deux expériences ont été faites dans les mêmes conditions (concentration en protéines de la matrice, temps d'adhérence, temps de fixation, marquage, ...). Les images moyennées sur une quinzaine de cellules sont représentées figure 4.5.

Le marquage des protéines phosphorylées sur la tyrosine (anticorps 4G10) nous permet de visualiser les plaques d'adhérences. En comparant les positions A et B sur la ligne pointillée rouge (Figure 4.5) correspondant respectivement au coin ayant le moins et le plus de tension, on remarque qu'il n'y a pas de différence d'intensité entre ces deux zones que ce soit sur verre ou sur gel. Les marquages vinculine et phospho-paxilline nous permettent d'avoir des informations sur la localisation de deux senseurs de force connus[45, 55]. En comparant cette fois les positions correspondant respectivement aux zones de faible et forte tension, on remarque une augmentation nette de l'intensité de fluorescence là où la tension est plus élevée, de 30% sur gel, et de 50% sur verre, montrant que l'on conserve bien la modulation de force sur verre. Pour confirmer ces données, l'acto-myosine a été analysée sur ces formes. Il apparaît qu'un même rapport d'intensité sur verre et sur gel existe entre la fibre non supportée (A), et la fibre supportée (B). La différence de concentration de la phospho-myosine montre donc que la fibre non supportée exerce plus de forces de traction que la fibre supportée, résultant en un différentiel de tension aux niveaux des plaques d'adhérences reliées à ces fibres.

Pour appuyer encore notre conclusion, nous avons également effectué des mesures de rigidité par AFM¹ au LIPhy pour observer la différence de rigidité due à une différence de tension le long de la fibre d'actine. Le principe est d'approcher de l'échantillon une sonde en forme de pyramide de quelques nanomètres de diamètre montée sur un levier aux caractéristiques mécaniques

1. Atomic Force Microscopy

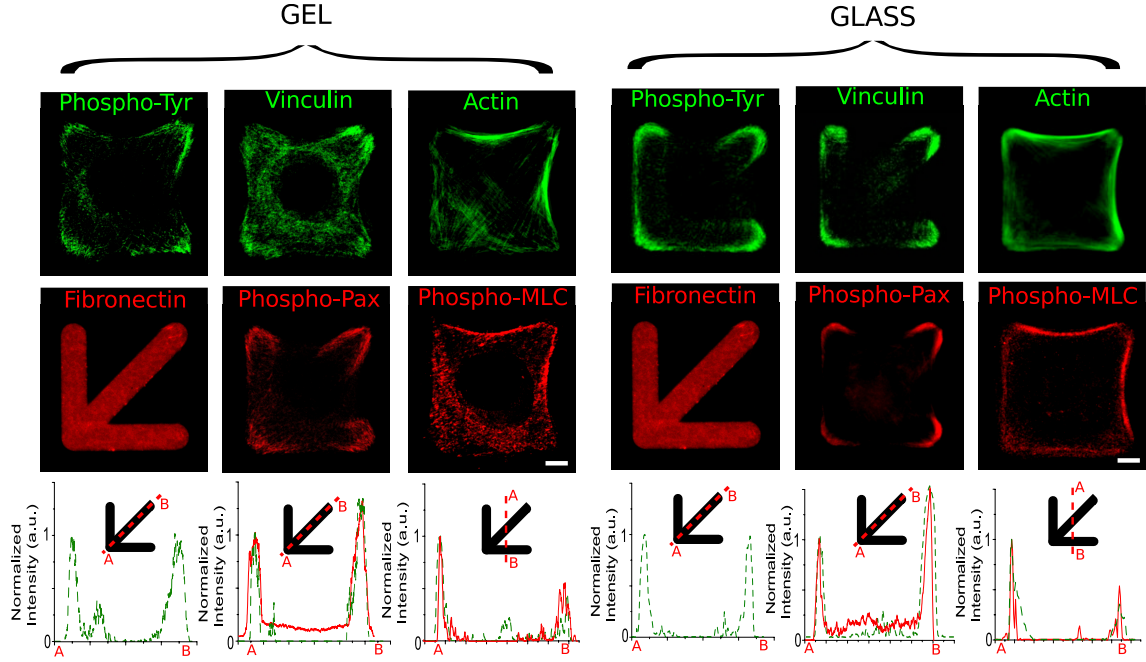


FIGURE 4.5: **Maintien de la modulation des forces de tractions entre gel et verre sur un motif en flèche.** En vert et rouge l'image moyenne des différents marquages de protéines mécanosensibles sur gel et sur verre ainsi que leur profil d'intensité. Les profils d'intensité correspondent à la moyenne des profils le long de la barre adhésive transversale. Les courbes vertes et rouges correspondent au profil d'intensité de l'image moyenne verte et rouge situées au-dessus. Le marquage phospho-tyrosine et le profil d'intensité nous montre que sur gel ainsi que sur verre la concentration en intégrine est la même entre la zone sous faible (A) et forte tension (B). Le marquage vinculine et phospho-paxilline servent à localiser ces bio-senseurs de forces. On remarque en comparant les zones sous faible et forte tension un différentiel de 30% en intensité sur gel amplifié sur verre (50%). En observant l'actine et les phospho-myosines, il est possible de remarquer une concentration plus importante en myosine activé sur les bords non-adhésifs (A) comparé au bord adhésif (B). Barre d'échelle= $5\mu\text{m}$.

connues, et d'observer la déflexion du levier quand la sonde entre en contact avec l'échantillon (Figure 4.6). La pente de cette déflexion donne une information sur la rigidité de l'échantillon (équation 4.1). Des calibrations ont été effectuées pour connaître les propriétés mécaniques du levier (Sensibilité=49,30nm/V ; constante de raideur $k=11,83\text{mN/m}$). L'indentation dans

l'échantillon a été limité à 800nm pour éviter que les mesures de rigidités ne soient biaisées par le verre sous la cellule.

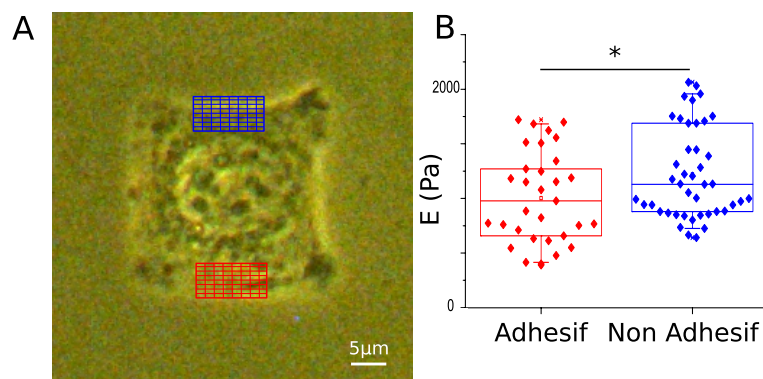


FIGURE 4.6: **Sur un motif de fibronectine en flèche sur verre, la fibre non-soutenue est significativement plus rigide que la fibre soutenue.** A. Visualisation par microscopie à contraste de phase d'une cellule MEF adhérant sur un micromotif en flèche sur fibronectine sur verre. En rouge et bleue les grilles des différents points analysés par AFM. B. Les mesures correspondant aux zones rouge et bleue. Il apparaît une augmentation significative de la rigidité de la fibre non-soutenue, dû à l'augmentation de la tension le long de la fibre.

$$F = k \times \Delta x \quad (4.1)$$

L'analyse statistique montre une différence significative entre la rigidité mesurée au-dessus d'un bord adhésif ($E = 1001 \pm 424 Pa$) et non-adhésif ($E = 1218 \pm 418 Pa$). Cependant, les mesures n'ont été effectuées que sur deux cellules. Malgré une statistique de 20 points par cellule, elle ne permet pas d'affirmer une différence forte de comportement, mais elle ajoute cependant un autre argument allant dans la direction d'une différence de tension contrôlée entre les différentes zones de la cellule en adhérence sur un motif sur verre.

4.2 Lien entre tension et mobilité des intégrines

Maintenant que nous avons mesuré la modulation de la distribution des forces exercées par la cellule entre les différentes zones, et que nous avons démontré que cette distribution est maintenue sur verre, nous allons pouvoir mesurer directement la dynamique des intégrines en fonction de la tension cellulaire appliquée au substrat. Les intégrines que nous avons choisies d'étudier sont les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ sur fibronectine. La fibronectine est la matrice extra-cellulaire reconnue par les deux intégrines. Il est donc possible de comparer le comportement de $\beta 1$ et $\beta 3$ dans les mêmes conditions. $\beta 1$ est connue pour être l'intégrine responsable de la génération de force sur fibronectine[83]. $\beta 3$ est connue pour être le régulateur de $\beta 1$ [93, 114]. Étudier la relation et les interactions entre $\beta 1$ et $\beta 3$ nous permet donc d'avoir une idée globale sur le processus de mécanotransduction cellulaire.

Nous avons tout d'abord essayé la technique qui, d'après la littérature[116], est la plus adaptée à la diffusion des intégrines dans une membrane, c'est à dire la méthode RICS (Figure 4.7).

4.2.1 Le RICS ne nous permet pas d'étudier la dynamique des intégrines

Même si la technique du RICS permet l'étude de dynamique de protéines impliquées dans les adhérences focales telle que la paxilline[39], les intégrines n'ont jamais à ce jour été observées par RICS. La paxilline est une protéine cytoplasmique ayant ainsi une vitesse de diffusion largement supérieure aux intégrines. Pour vérifier que la technique est adaptée aux faibles mobilités des protéines transmembranaires, nous avons effectué quelques tests en mesurant la dynamique de $\beta 3$ -GFP sur substrat en verre homogène.

Pour pouvoir comparer nos résultats avec les résultats de SPT[116], nous analysons les films en enlevant de l'analyse les zones de l'image situées hors de

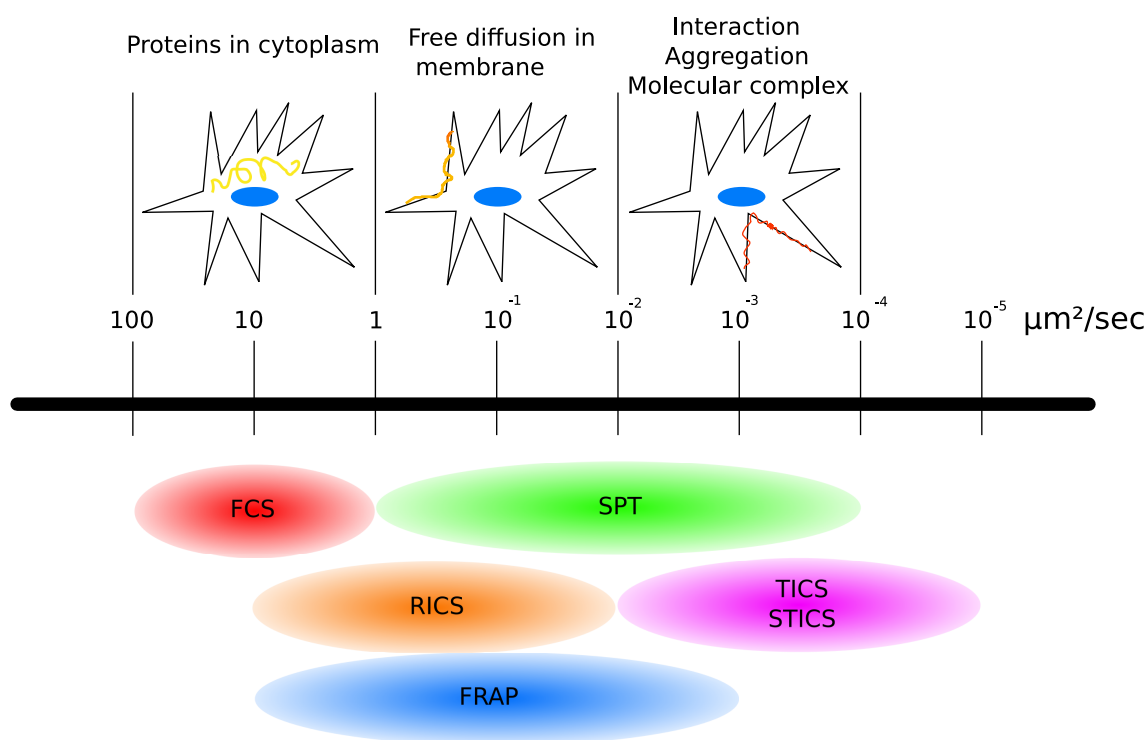


FIGURE 4.7: **Gamme temporelle explorable par les différentes techniques de mesures de mobilité.** Il apparaît que la technique RICS est particulièrement adapté aux protéines membranaires. Image inspiré du site <http://www.olympusaustalia.com.au/>

la cellule (Figure 4.8.c en bleu). Les adhérences focales sont déterminées par seuillage d'intensité (Figure 4.8.c en rouge). Nous nous sommes intéressés à comparer la diffusion des intégrines dans et en dehors des plaques focales. Les données de RICS ont été analysées en ajustant les courbes avec un modèle de diffusion à 2D avec une seule composante. En superposant les histogrammes obtenus en RICS avec l'histogramme en SPT, on remarque que la technique de RICS donne des résultats cohérents avec ceux de la SPT en dehors des plaques d'adhérence. De plus, la constante de diffusion moyenne dans les plaques ($D_P = 0,19 \pm 0,20 \mu m^2/sec$) est plus faible par rapport à la constante de diffusion hors plaques ($D_{HP} = 0,29 \pm 0,21 \mu m^2/sec$). Le deuxième chiffre après la valeur moyenne représente l'écart-type des temps de diffusion.

Malgré cela, on remarque facilement que les molécules les plus lentes

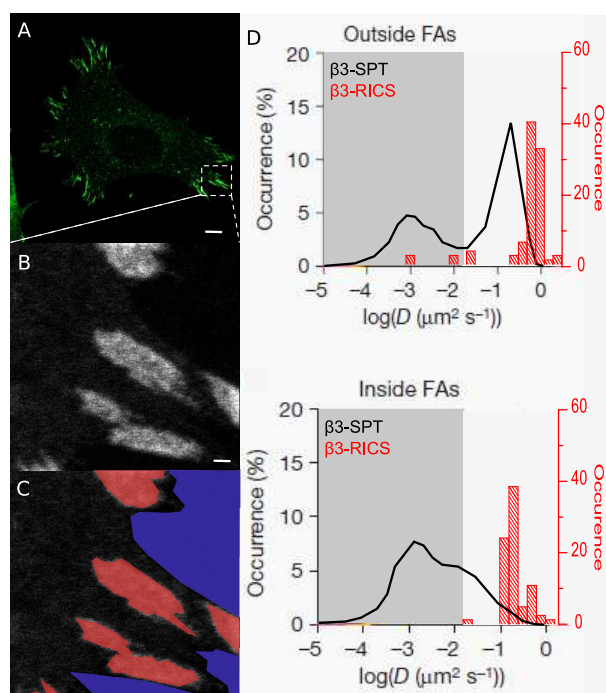


FIGURE 4.8: **Le RICS ne permet pas d'estimer l'ensemble de la distribution des mobilités de l'intégrine $\beta 3$ -GFP sur verre** A. Cellules MEF $\beta 3^{-/-}$ + $\beta 3$ -GFP adhérant sur un substrat en verre homogène, B. Région analysée en RICS, C. Segmentation des zones hors cellule (bleue, non analysées), plaques d'adhérence (rouge), et hors plaque (noire), D. Superposition des résultats obtenus en SPT[116] avec nos résultats obtenus par RICS. On remarque un temps de diffusion hors plaques proches entre la technique SPT et le RICS. Cependant, au niveau des plaques, on observe un ralentissement des temps de diffusion par RICS, mais pas aussi important que celui mesuré par SPT, laissant penser que nous avons atteint la limite de la technique. Barre d'échelle a : $10\mu\text{m}$, b : $1\mu\text{m}$

présentes dans les plaques d'adhérences ne sont pas détectées et mesurées par RICS. Nous avons donc décidé suite à cela d'utiliser une alternative au RICS ayant une gamme temporelle d'étude plus lente, la technique appelée Temporal ICS.

4.2.2 $\beta 1$ -GFP ne change pas sa mobilité en réponses aux contraintes mécaniques

Nous nous sommes, dans un premier temps, penchés sur la dynamique de l'intégrine $\beta 1$ en fonction du niveau de tension, $\beta 1$ étant connu pour être la protéine responsable de la génération des forces sur fibronectine[93]. Les cellules utilisées pour cela ont été des MEF $\beta 1^{-/-}$ $\beta 1$ -GFP. Les cellules ont été triées pour obtenir un taux d'expression de surface normal. Cette construction permet de ne pas avoir une sur-expression en intégrine $\beta 1$ et de pouvoir visualiser toutes les intégrines. Les cellules ont été testées et choisies pour avoir un comportement comparable aux cellules sauvages en terme de force[93] (Figure 4.9).

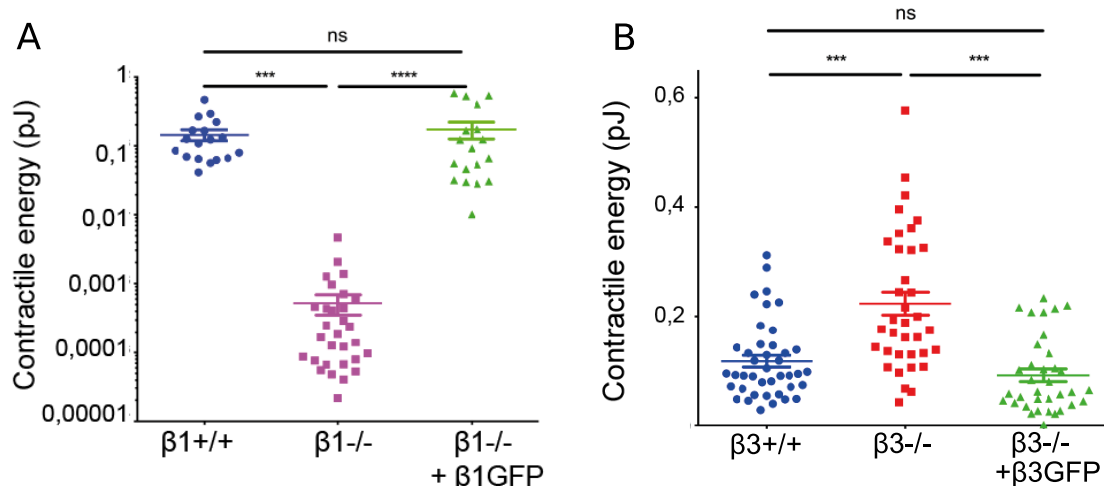


FIGURE 4.9: **Restauration de l'énergie contractile de la cellule déplétée en intégrine par ré-expression de l'intégrine fusionnée à la GFP[93].** En effectuant des mesures de TFM sur substrat homogène, il est possible de comparer le niveau de force de traction globale exercé par la cellule. A. La dépletion de l'intégrine $\beta 1$ conduit à une chute drastique du niveau de forces de traction, restaurée par la ré-expression de l'intégrine fusionnée à la GFP, confirmant son rôle de générateur de force sur fibronectine. B. La dépletion de l'intégrine $\beta 3$ conduit à une hausse significative du niveau de forces de tractions, restaurée par la ré-expression de l'intégrine fusionnée à la GFP, confirmant son rôle de régulateur négatif de l'intégrine $\beta 1$ sur fibronectine.

$\beta 1$ est une intégrine essentielle pour l'adhérence de la cellule et la création de force sur ce type de matrice. Les résultats sur le temps de résidence de l'intégrine $\beta 1$ -GFP en fonction des régions montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre le niveau de force et la mobilité de l'intégrine (Figure 4.10). Il est important de noter que dans le cas des expériences de tICS, la résolution est telle que nous pouvons analyser séparément les plaques d'adhérences donnant sur un bord adhésif ou non adhésif (Zone Orange/Magenta). La distribution des temps de résidence sont tous très proches et non significativement différents (~ 150 secondes).

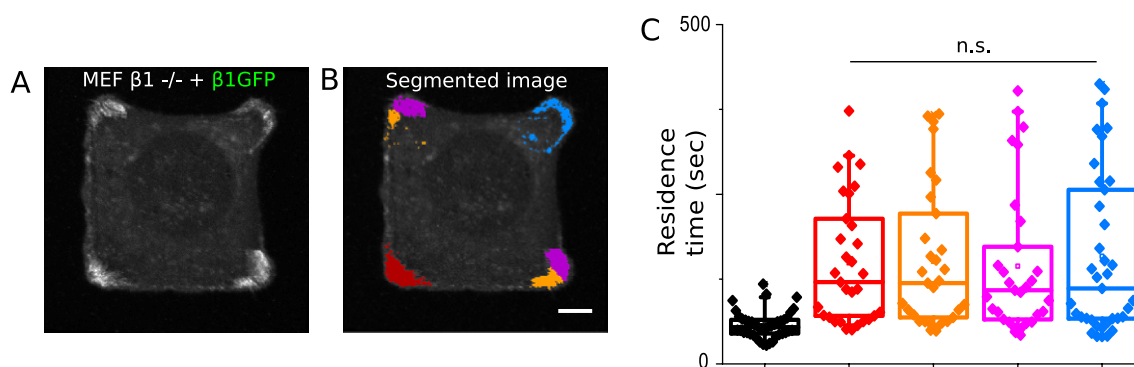
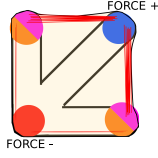


FIGURE 4.10: Absence de modulation de la mobilité de l'intégrine $\beta 1$ -GFP en fonction de la localisation par tICS. A. Des cellules MEFs $\beta 1^{-/-}$ + $\beta 1$ -GFP sont mises en culture sur un motif en flèche sur verre-fibronectine puis observées pendant quelques minutes. B. Les plaques d'adhérences sont segmentées selon la localisation et la structure des fibres de stress qui sont ancrées dans ces plaques : deux bords adhérents (Rouge), un bord adhérent (Orange), un bord non-adhérent (Magenta) ou deux bords non-adhérents (Bleue). C. On remarque que la distribution des temps de résidence est semblable dans les quatre coins de la cellule, donc indépendant du niveau de force. Barre d'échelle $5\mu\text{m}$.

De premières analyses statistiques tendaient à montrer que le nombre de molécule était fortement corrélé avec le niveau de force.

$$N_{\text{Rouge}} = \sim 780 \pm 600 \text{ molécules}/\mu\text{m}^2; N_{\text{Orange}} = \sim 750 \pm 600 \text{ molécules}/\mu\text{m}^2$$



CHAPITRE 4. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

$$N_{Magenta} = \sim 900 \pm 600 \text{ molécules}/\mu\text{m}^2; N_{Bleue} = \sim 1000 \pm 800 \text{ molécules}/\mu\text{m}^2$$

Une analyse plus fine indique cependant qu'il n'est pas possible de conclure de manière formelle. Nous concluons donc que ni la concentration, ni la dynamique de l'intégrine $\beta 1$ ne sont sensibles au niveau de force de traction.

4.2.3 $\beta 3$ -GFP module sa mobilité en réponses aux contraintes mécaniques

Nous avons ensuite fait les mêmes expériences sur des MEF $\beta 3^{-/-} \beta 3$, ré-exprimant $\beta 3$ fusionnée à la GFP. Cette construction nous permet, comme pour le cas de $\beta 1$, de visualiser le comportement de toutes les intégrines $\beta 3$ sans sur-expression et d'obtenir des cellules ayant un comportement normal en terme de génération de force (Figure 4.9 page 98). L'intégrine $\beta 3$ est connue pour être le régulateur de $\beta 1$ sur fibronectine[115].

Au contraire de $\beta 1$, l'analyse des temps de résidence de l'intégrine $\beta 3$ -GFP révèle que le temps de résidence de l'intégrine $\beta 3$ -GFP est fortement corrélé avec la tension intracellulaire dans les régions d'intérêts (Figure 4.11). Une hausse de la tension se traduit par un ralentissement de $\beta 3$ -GFP dans les sites adhésifs.

En comparant par exemple les zones Orange et Magenta (voir image médaillon à la place des numéros de page paire), on observe une différence significative du temps de résidence malgré leur proximité géographique. Une similarité forte entre les deux régions situées près d'un bord adhésif (Rouge/Orange) ainsi qu'entre les deux régions situées près d'un bord non-adhésif est visible. De plus, chaque test statistique comparant une région proche d'un bord adhésif à une région proche d'un bord non-adhésif montre une différence significative en terme de temps de résidence. Il semblerait ainsi que les points d'ancrage des deux cotés de la fibre d'actine se comporte de la même manière vis à vis de la tension. Il existe donc une régulation locale de la mobilité en réponse aux contraintes mécaniques.

Cette capacité à moduler son temps de résidence en fonction du niveau de force renforce l'idée de rôle de régulateur de l'intégrine $\beta 3$. En terme de

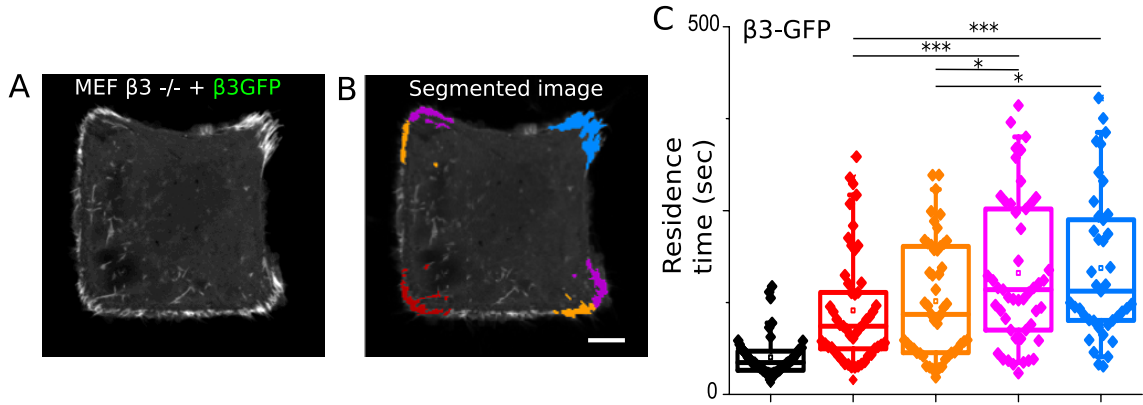


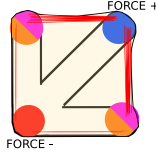
FIGURE 4.11: **Le temps de résidence de l'intégrine $\beta 3$ -GFP est corrélé au niveau de force de traction.** A. Des cellules MEFs $\beta 3^{-/-} + \beta 3$ -GFP sont mise en culture sur un motif en flèche sur verre sur fibronectine puis observer pendant quelques minutes. B. Les plaques d'adhérences sont segmentées comme dans la figure 4.10. C. On remarque que la distribution des temps de résidence est significativement différente entre les intégrines proches des bords adhésifs (Rouge/Orange) et non-adhésifs (Magenta/Bleue), montrant un comportement fortement corrélé au niveau de force. Barre d'échelle $5\mu\text{m}$

nombre de molécules, un autre fait intéressant est révélé. Au contraire de $\beta 1$ -GFP, il semble que le nombre de molécule soit inversement corrélé au niveau de tension pour $\beta 3$ -GFP. C'est à dire que le nombre de molécules est plus faible là où la tension est la plus forte.

$$N_{Rouge} = \sim 720 \pm 700 \text{molécules}/\mu\text{m}^2; N_{Orange} = \sim 710 \pm 680 \text{molécules}/\mu\text{m}^2$$

$$N_{Magenta} = \sim 380 \pm 360 \text{molécules}/\mu\text{m}^2; N_{Bleue} = \sim 420 \pm 400 \text{molécules}/\mu\text{m}^2$$

Ces deux observations sur la mobilité et la concentration de $\beta 3$ -GFP ne vont cependant pas dans le même sens que les mesures faite par FRAP[8]. Dans cette étude , une différence sur la mobilité de $\beta 3$ a été démontrée en



CHAPITRE 4. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

comparant des plaques $\beta 3$ -GFP de faibles et fortes intensités. Cependant, le lien direct avec les forces est remis en cause[131]. De plus, les cellules n'étant pas sur micromotifs, il est possible que le déplacement des structures affectent les mesures de FRAP.

Ces résultats sur $\beta 1$ et $\beta 3$ nous montrent une différence nette de comportement entre les deux intégrines. $\beta 1$ semble s'accrocher au substrat au niveau des adhérences focales et se détacher de manière constante et reproductible indépendamment du niveau de force de l'adhérence. Seul son nombre de molécule pourrait jouer un rôle dans la force exercée sur le substrat. $\beta 3$ semble s'accrocher au substrat et se détacher plus ou moins vite en fonction du niveau de tension dans l'adhérence focale. En cas de niveau de force faible, l'intégrine $\beta 3$ reste attachée sur des temps court. En augmentant le niveau de force, l'intégrine $\beta 3$ augmente son temps de résidence, se traduisant possiblement par une augmentation de stabilité de la plaque et une génération de force plus importante. De plus, $\beta 1$ et $\beta 3$ partageant la même matrice et les mêmes localisations sur fibronectine, la diminution de concentration de $\beta 3$ en corrélation avec l'augmentation de concentration de $\beta 1$ laisse penser que la plaque d'adhérence réagit à la tension en recrutant plus ou moins d'intégrine $\beta 1$ en fonction de la tension dans la plaque. $\beta 3$ se contente donc de diminuer sa présence, et d'augmenter son temps d'interaction pour recruter des protéines structurales servant à stabiliser le lien intégrine/actine tel que la vinculine ou la paxilline. Nous pouvons donc imaginer une compétition entre $\beta 3$ et $\beta 1$ pour se lier à la taline, $\beta 3$ ayant plus d'affinité pour la taline que $\beta 1$ [4, 45, 58] ou la kindline, la kindline ayant plus d'affinité pour $\beta 1$ que $\beta 3$ [94].

Souhaitant confirmer ces résultats, une autre mesure de mobilité moléculaire par FRAP a été utilisé afin de mesurer de manière semi-quantitative la mobilité de l'intégrine $\beta 3$ -GFP en fonction du niveau de force de traction.

4.2.4 Les mesures de FRAP confirment une variation de mobilité de $\beta 3$ -GFP en réponse à la tension

Pour confirmer la réelle différence de mobilité de $\beta 3$ entre la zone rouge de faible tension et la zone bleue de forte tension, nous avons effectué des mesures de FRAP simultanées entre ces deux régions puis comparé le temps de retour de fluorescence. En moyenne, le temps de retour dans la zone rouge est plus faible que dans la zone bleue (Figure 4.12), indiquant un taux d'échange plus important dans les plaques sous faible tension et donc un temps de résidence moins important.

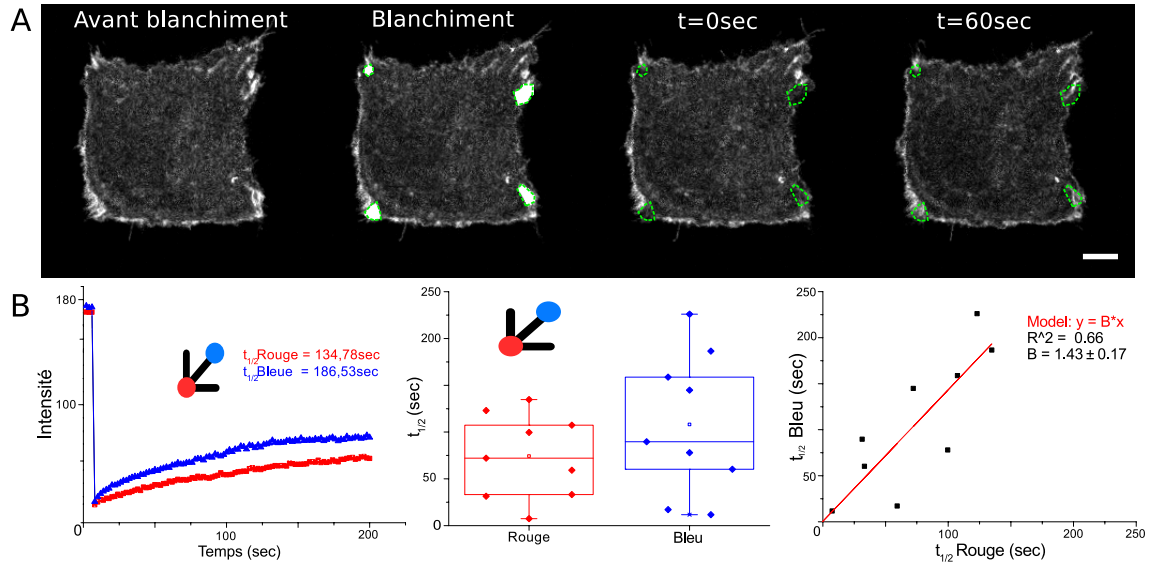
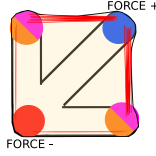


FIGURE 4.12: Les mesures de FRAP confirment les résultats de tICS sur la différence de mobilité entre les zones de faibles et fortes tensions sur verre-fibronectine. A. Des mesures de mobilité par retour de fluorescence sont effectuées sur des cellules MEF $\beta 3^{-/-}$ + $\beta 3$ -GFP. B. Le retour de fluorescence dans la zone de faible tension est plus rapide que dans la zone de forte tension, indiquant un temps de résidence plus important dans la zone de forte tension, en corrélation avec les conclusions faites par tICS sur ce même type cellulaire. Barre d'échelle $5\mu\text{m}$

$$t_{1/2} \text{ Rouge} = 74,25 \pm 45 \text{ sec} \quad t_{1/2} \text{ Bleu} = 108,08 \pm 75 \text{ sec}$$



CHAPITRE 4. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Les temps de retour de fluorescence obtenus par FRAP sont, de plus, du même ordre de grandeur que les résultats obtenus en tICS (~ 100 secondes). Nous retrouvons également le fait que le temps de résidence est plus long dans les zones où les intégrines sont reliées à des fibres de stress suspendues. Avec ces mesures, nous voyons en outre une corrélation entre les temps de retour dans les deux régions.

Ces expériences de FRAP confirment les résultats observés en tICS, c'est à dire un temps d'interaction plus important dans les plaques sous tension comparé aux plaques avec tension plus faible, contrairement aux expériences faite par Ballestrem & al [8].

En conclusion, nous avons vu qu'un changement tensionnel permet de moduler la dynamique de l'intégrine $\beta 3$ -GFP et non de $\beta 1$ -GFP. La mobilité de $\beta 3$ -GFP est mécanosensible, ce qui va dans le sens d'un rôle de régulateur. Ces observations mise en lien avec les conclusions sur l'absence de diffusion de la taline en dehors des plaques[116] mettent en avant comme dit précédemment un modèle de coopération entre $\beta 1$ -GFP et $\beta 3$ -GFP par compétition, la plaque agissant comme un filtre à intégrine recrutant préférentiellement l'intégrine $\beta 1$ ou $\beta 3$ en fonction du niveau de tension dans la plaque. Nous nous sommes donc intéressés à l'identification du type d'interaction permettant la régulation de la dynamique de $\beta 3$. Cette régulation se fait-elle via une modification de son affinité avec la matrice extra-cellulaire, ou via les interactions avec les protéines adaptatrices se trouvant dans le cytoplasme ?

4.3 Base moléculaire de la mécanosensibilité

Pour répondre à cette question, nous avons effectué des mesures de mobilité par tICS sur des cellules produisant des intégrines chimères $\beta 1 - \beta 3$, puis observé si leur comportement se rapprochait plutôt du comportement de l'intégrine $\beta 1$ -GFP ou $\beta 3$ -GFP WT².

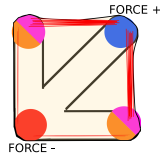
4.3.1 Le domaine cytoplasmique est responsable du comportement des intégrines

Les cellules utilisées pour les deux expériences ont été des cellules $\beta 3$ -/- ré-exprimant une chimère fusionnée avec la GFP (Figure 4.13). Les chimères sont construites de manière à avoir la partie cytoplasmique (CD) d'une intégrine donnée fusionnée au domaine transmembranaire et extra-cellulaire (ECD) de l'autre intégrine (Figure 4.13a.).

En terme de distribution du signal de fluorescence provenant des adhérences focales sur les images moyennes, on remarque une similarité plus forte entre les images moyennes $\beta 1$ -GFP avec la chimère $\beta 1$ -ECD/ $\beta 3$ -CD, et $\beta 3$ -GFP avec la chimère $\beta 3$ -ECD/ $\beta 1$ -CD, semblant indiquer que l'aspect structural des adhérences focales est gouverné par l'interaction entre l'intégrine et la matrice extra-cellulaire (Figure 4.13b.). En effet, on peut voir une absence de plaques d'adhérence sur les bords adhésifs inférieur et gauche de la cellule pour $\beta 1$ -GFP et $\beta 1$ -ECD/ $\beta 3$ -CD. De plus, le signal des intégrines provenant des zones hors plaques est plus difficile à discriminer pour ces deux phénotypes. Pour l'autre paire d'intégrine $\beta 3$ -GFP $\beta 3$ -ECD/ $\beta 1$ -CD, on remarque les présences d'adhérences focales sur les bords adhésifs inférieur et gauche, ainsi qu'une discrimination aisée entre les zones plaques et hors plaques.

En regardant les résultats sur les temps de résidence, on observe que la chimère $\beta 3$ -ECD/ $\beta 1$ -CD ne modulent pas sa dynamique en fonction de la tension, avec des temps de résidence similaire à $\beta 1$ -WT (Figure 4.13b.). Ce résultat nous laisse penser que la partie cytoplasmique de l'intégrine est res-

2. Wild-type



CHAPITRE 4. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

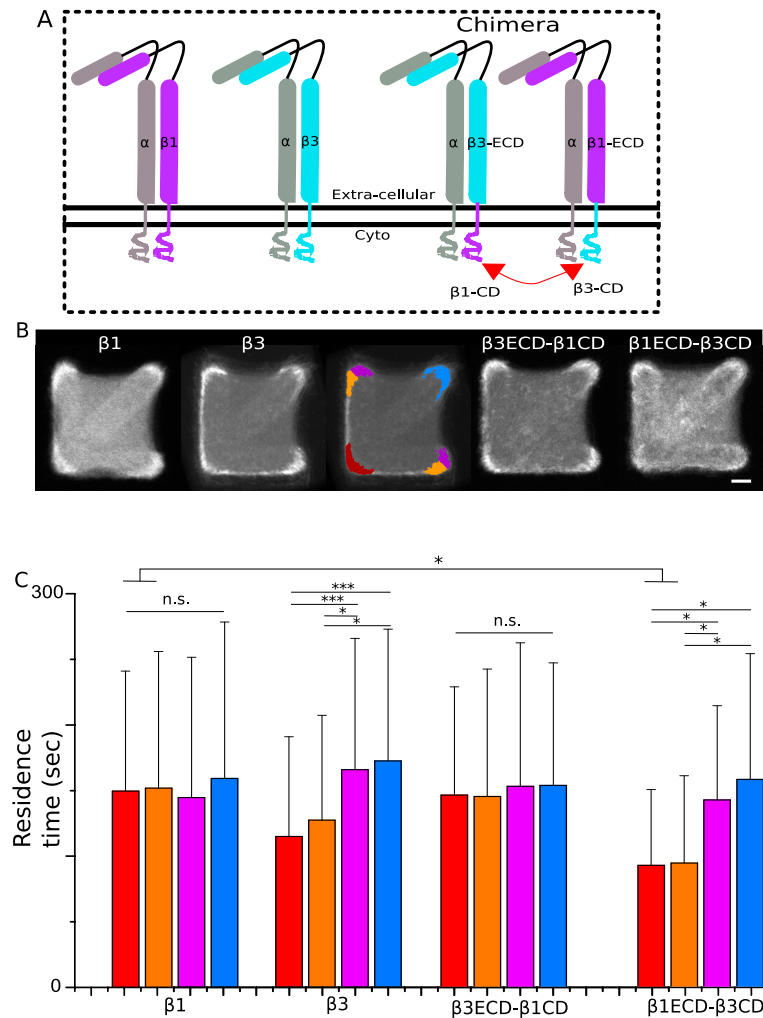
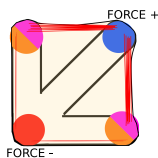


FIGURE 4.13: Les chimères $\beta 1/\beta 3$ se comportent comme l'intégrine se trouvant au niveau cytoplasmique. A. Schéma des différentes constructions d'intégrines analysées par tICS. B. Les images moyennes de la fluorescence de la GFP des cellules analysées ($n=50$). On montre que la fluorescence de la chimère $\beta 3$ -ECD/ $\beta 1$ -CD se rapproche de la fluorescence de la cellule exprimant $\beta 3$ -GFP et inversement, indiquant la dépendance de la forme des adhérences focales à la partie extra-cellulaire de l'intégrine. C. En terme de mobilité, on remarque un comportement similaire entre la cellule exprimant $\beta 3$ -GFP avec la chimère $\beta 1$ -ECD/ $\beta 3$ -CD et inversement, montrant la fonction essentielle de la partie cytoplasmique de l'intégrine $\beta 3$ -GFP pour encoder sa mobilité de manière mécanosensible.

ponsable de la régulation de la dynamique des intégrines. De manière complémentaire, la chimère $\beta 1$ -ECD/ $\beta 3$ -CD se comporte au contraire comme $\beta 3$ -GFP montrant que le domaine cytoplasmique de $\beta 3$ est capable de modifier son temps d'interaction en fonction de la force. La mécanosensibilité de la mobilité de $\beta 3$ est encodée dans ce domaine cytoplasmique.

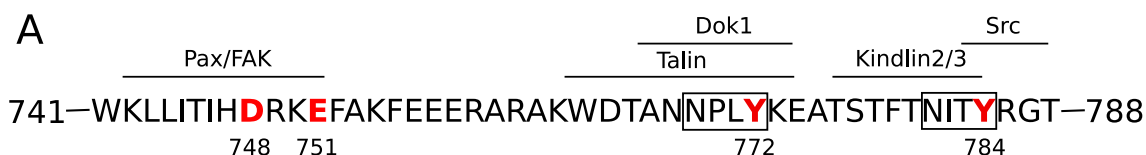
Voulant pousser plus loin le raisonnement, nous nous sommes demandés quels partenaires permettaient à l'intégrine $\beta 3$ de modifier sa dynamique. Pour cela, nous avons effectué des mesures de dynamique sur plusieurs mutants de $\beta 3$ n'interagissant pas avec certaines protéines adaptatrices importantes dans le processus de mécanotransduction.



CHAPITRE 4. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

4.3.2 La phosphorylation du site de la taline et kindline essentielle pour la régulation de la dynamique des intégrines

Les différents mutants ainsi que les mutations génétiques effectuées ont été répertoriées dans le tableau 4.1.



B

Mutation	Effet
N304T	Intégrine toujours en conformation activée
D748A + E751A	Pas d'interaction avec Paxilinne/Focal Adhesion Kinase
Y772A (NxxY proximal)	Pas d'interaction avec la taline
Y784A (NxxY distal)	Pas d'interaction avec la kindline
Y772F	Pas de phosphorylation du site de la taline
Y784F	Pas de phosphorylation du site de la kindline

TABLE 4.1: **Tableau des différentes mutations faites sur l'intégrine $\beta 3$ -GFP.** A. la séquence d'acide aminée de la partie cytoplasmique de l'intégrine $\beta 3$ ainsi que ces principaux interacteurs[84]. B. Les différentes mutations possibles et leurs effets sur les interactions.

La mutation N304T est une mutation ponctuelle de la partie extra-cellulaire de $\beta 3$ -GFP qui permet de bloquer l'intégrine en position ouverte, permettant à l'intégrine de se lier directement à la matrice extra-cellulaire sans forcément être pré-activé par la taline et la kindline. En observant les différences de comportement en terme de temps de résidence entre l'intégrine $\beta 3$ -WT et ce mutant, les deux intégrines semblent se comporter de la même manière vis à vis du niveau de force (Figure 4.14).

Cette conclusion est une autre preuve allant dans la direction que la modulation de mobilité se fait via l'interaction entre l'intégrine et les protéines

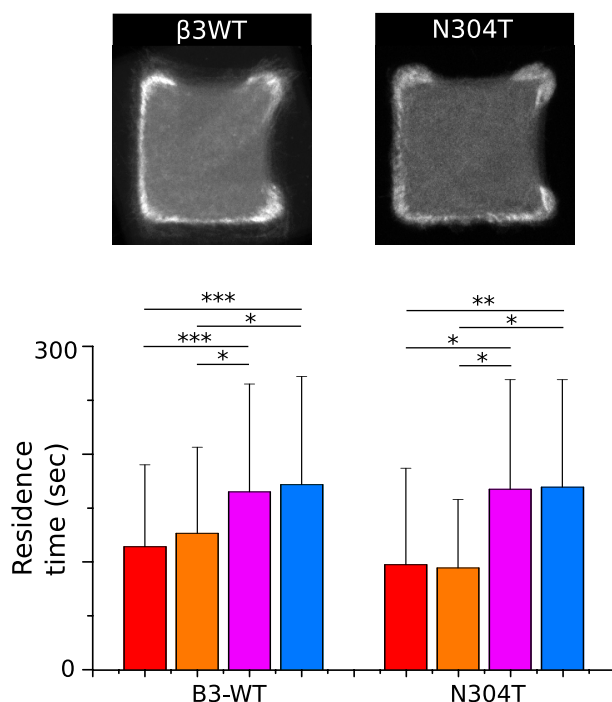
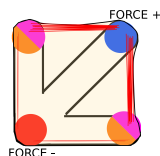


FIGURE 4.14: **Pas d'impact de la mutation N304T sur le comportement de l'intégrine $\beta 3$ -GFP.** En comparant les temps de résidence de l'intégrine $\beta 3$ -GFP muté, il est visible que le comportement de l'intégrine est similaire pour ces deux phénotypes.

adaptatrices dans le cytoplasme.

Il apparait que la paxilline est une protéine mécanosensible importante dans la réponse cellulaire aux contraintes mécaniques. La paxilline une fois phosphorylé par FAK aurait comme rôle principal de venir recruter la vinculine et stabiliser le lien entre la taline et l'actine et renforcerait ainsi le lien entre le cytosquelette et l'intégrine[26, 53, 134]. La mutation D748A/E751A induit une absence d'interaction entre l'intégrine et la paxilline et la Focal Adhesion Kinase. Le phénotype conduit à des plaques d'adhérences d'allure normale comparées aux plaques d'adhérences du $\beta 3$ -GFP WT, ainsi que des temps de résidence comparables aux temps obtenus sur le phénotype sauvage pour chaque région (Figure 4.15). Il semblerait donc que cette interaction n'est pas celle qui gouverne la modulation de temps de résidence.

Une mutation sur la tyrosine du premier site NxxY (Y772A) empêche



CHAPITRE 4. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

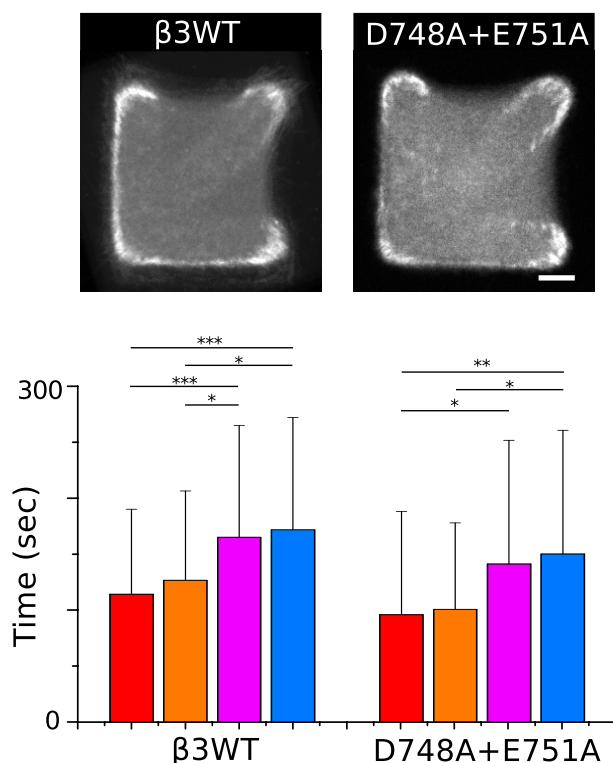


FIGURE 4.15: **Pas d'impact de la mutation D748A+E751 sur le comportement de l'intégrine $\beta 3$ -GFP.** Le fait de bloquer l'interaction entre l'intégrine $\beta 3$ et la paxilline ainsi que FAK ne semble pas modifier le comportement de l'intégrine $\beta 3$ -GFP en terme de temps de résidence. L'intégrine continue à réguler son temps de résidence avec des valeurs comparables au type sauvage dans chaque coin.

l'intégrine de se lier à la taline[3, 22]. Avec ce phénotype, l'intégrine est donc toujours en conformation dite "fermée", ne pouvant pas être activée par la taline et ne pouvant pas lier la matrice extra-cellulaire. On observe donc sur l'image moyenne une absence de plaque d'adhérence et un temps de résidence très court correspondant à l'intégrine diffusant librement dans la membrane (Figure 4.16). Ceci montre qu'il y a un phénomène actif de sélection des intégrines dans les plaques par l'interaction entre les intégrines et les activateurs, la suppression de l'interaction avec l'un des deux activateurs étant suffisant pour empêcher la formation de plaques d'adhérences.

Une mutation sur la tyrosine du deuxième site NxxY (Y782A) mène un

phénotype similaire dû à une absence d'interaction avec la kindline[14]. Même l'interaction avec la taline seule ne permet pas la formation de plaques d'adhérences et les temps de résidence observés correspondent à la dynamique de l'intégrine muté en dehors des plaques d'adhérences (Figure 4.16).

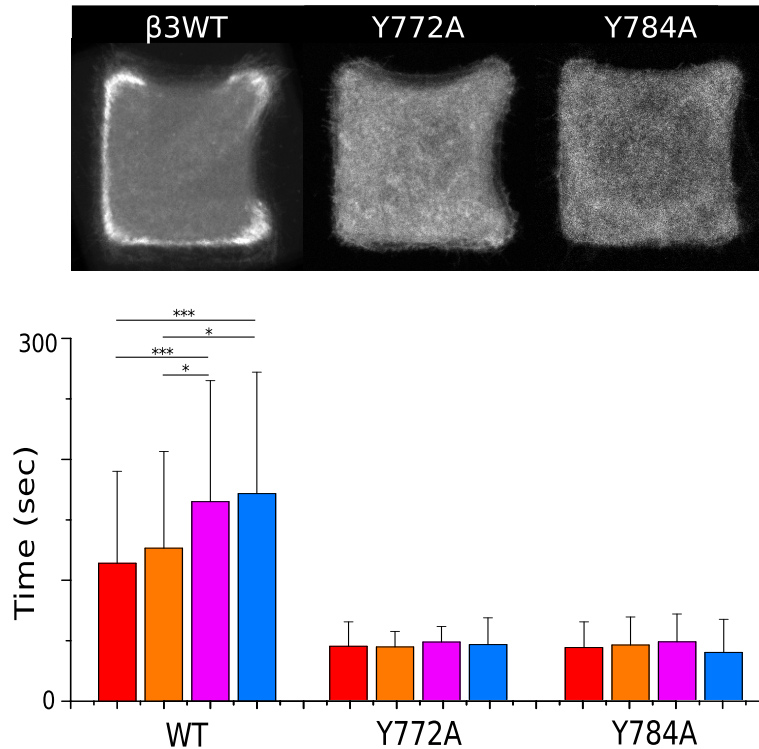
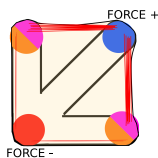


FIGURE 4.16: La mutation en alanine des tyrosines sur les deux sites NxxY empêchent la formation de plaque d'adhérence. En laissant adhérer ces mutants sur des motifs de fibronectine en flèche sur verre, on observe un signal de fluorescence homogène au niveau basal de la cellule, sans formation d'agrégats dans les coins.. Tout le signal de fluorescence de la cellule correspond donc à des intégrines diffusant dans la membrane. Les mobilités mesurées sont donc rapides et comparables avec la mobilité des intégrines diffusant hors plaque dans le type sauvage.

Pour pouvoir tout de même tester l'effet de la liaison entre la taline et la kindline sur l'intégrine, nous avons eu l'idée de tester différentes mutation sur ces tyrosines, permettant la liaison entre l'intégrine et ces activateurs, mais modifiant la dynamique de ces interactions. En effet, le premier site NxxY est une plateforme d'interaction pour deux protéines antagonistes, la taline



CHAPITRE 4. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

servant d'activateur d'intégrine, et Dok1 servant d'inhibiteur de l'intégrine. Dans sa forme NxxY, le site aura plus d'affinité pour la taline[3, 98] que pour Dok1. La phosphorylation des sites NxxY bloque l'interaction entre l'intégrine et ses activateurs, mais pas ses inhibiteurs. Les mutants Y->F bloque cette phosphorylation et les intégrines lient essentiellement la taline ou la kindline. La rupture du lien entre la taline et l'intégrine n'est ainsi plus stimulée par l'interaction entre l'intégrine et Dok1. Au lieu de bloquer totalement l'interaction entre l'intégrine et l'activateur, nous jouons donc ici sur leur dynamique de désengagement et on suppose le temps de vie de l'interaction intégrine/activateur.

En observant les résultats des temps de résidence pour ces deux mutants, on observe une perte de capacité des cellules à moduler leur temps de résidence en fonction de la force (Figure 4.17).

La modification sur ces deux sites restent cependant très différente. La mutation sur le site de la taline semble avoir comme effet de moyenniser les temps de résidence autour d'une valeur comprise entre le temps de résidence des zones fortes et de faibles tension. La mutation sur le site de la kindline semble lui n'avoir aucun impact sur les temps de résidence des protéines se trouvant dans les zones de fortes tensions, mais à tendance à rallonger de manière significative le temps de résidence dans les zones de faibles tensions.

En terme de force, des mesures de TFM sur substrat homogène ont été effectuées sur ces types cellulaires par Rachel MILLOUD[93]. Elle a observé une différence forte de la force exercée par la cellule dans le cas d'une déplétion du gène codant pour la protéine $\beta 3$, démontrant un rôle de régulateur négatif de la force pour les MEF sur un substrat à 5kPa (Figure 4.9). En effectuant les mesures sur les mutants où la phosphorylation du site d'interaction pour la taline et la kindline était impossible, il a été montré que seul la phosphorylation de la tyrosine du site NxxY distal (site kindline) était importante pour la régulation de l'énergie contractile appliquée au substrat (Figure 4.18).

Nos résultats sur le temps de résidence permettent d'interpréter ces résul-

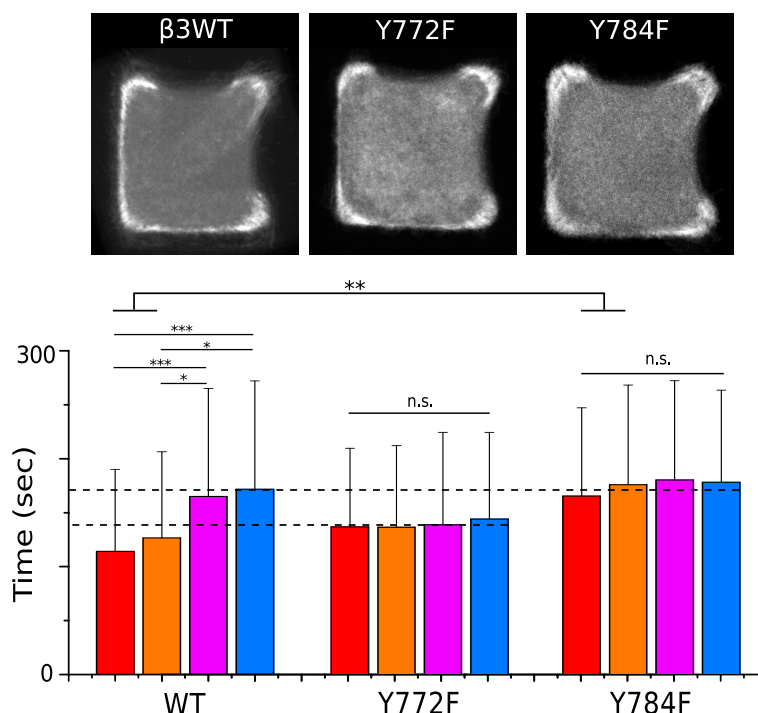
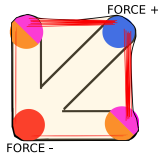


FIGURE 4.17: La mutation en phénylalanine des tyrosines sur les deux sites NxxY modifie la réponse de l'intégrine $\beta 3$ -GFP aux contraintes mécaniques. La mutation ne semble pas avoir un effet sur la structure des intégrines, les adhérences étant comparables en taille et intensité au plaques $\beta 3$ -GFP sauvage. Les deux mutants semblent perdre la capacité de réguler leur temps de résidence en fonction de la force de traction. Le mutant Y772F a tendance à moyenniser ses temps de résidence dans toutes les régions. Le mutant Y784F a tendance à réhausser de manière significative ses temps de résidence.

tats d'un point de vue dynamique. Nous avons conclu à partir des expériences sur le temps de résidence de $\beta 3$ -GFP que l'augmentation de la force induit une augmentation du temps de résidence. Cette capacité à réguler son temps de résidence en fonction de la tension semble être la caractéristique permettant à $\beta 3$ -GFP de réguler les forces de tractions.

Dans le cas de la mutation sur le site NxxY proximal (taline), nos expériences montrent que la cellule se comporte de manière similaire au WT en terme de force, c'est à dire que la mutation sur l'intégrine $\beta 3$ ne l'empêche pas de jouer son rôle de régulateur de force (Figure 4.17, 4.18). En terme



CHAPITRE 4. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

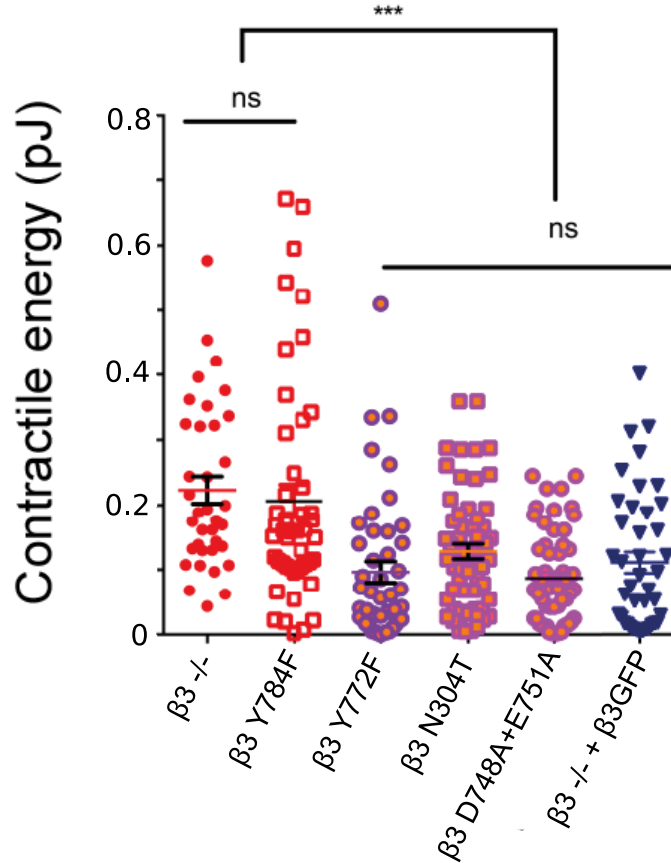


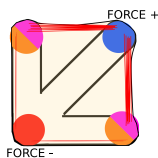
FIGURE 4.18: **La mutation sur le site NxxY distal ne permet pas la restauration de l'action de la ré-expression de l'intégrine $\beta 3$ -GFP.** La déplétion de l'intégrine $\beta 3$ se traduit par une augmentation de la force de traction exercée par la cellule[93]. La ré-expression de l'intégrine $\beta 3$ -GFP permet de restaurer le phénotype sauvage. En effectuant les mêmes mesures sur différents mutants de l'intégrine $\beta 3$, on observe que la mutation NxxY distal ne permet pas la restauration le phénotype sauvage, illustrant l'aspect essentiel de la régulation de l'interaction entre l'intégrine $\beta 3$ et la kindline dans l'établissement des forces de tractions.

de dynamique, d'un point de vue populationnel, la perte de la modulation du temps de résidence ne veut pas dire que l'intégrine $\beta 3$ -GFP muté sur son site proximal ne peut plus moduler son temps de résidence, mais qu'elle ne module plus son temps de résidence en fonction de la localisation. Cela ne

l'empêche cependant pas de continuer à réguler les forces de traction.

Dans le cas de la mutation sur le site NxxY distal (kindline), les expériences de TFM montrent que la ré-expression de l'intégrine $\beta 3$ mutée ne permet pas de restaurer le phénotype sauvage. En terme de dynamique, on perd également la modification du temps de résidence en fonction du niveau de tension, car toutes les intégrines semblent être ralenties, empêchant l'intégrine $\beta 3$ de réguler $\beta 1$. Cette incapacité à réguler son temps de résidence, ainsi que l'augmentation du temps de résidence dans toutes les régions de la cellule se traduit d'après nos hypothèses par une augmentation globale de la force exercée par la cellule sur le substrat.

Ces résultats confortent notre idée initiale de lien entre la mobilité de $\beta 3$ et les forces exercées par la cellule. De plus, nous pouvons conclure que la capacité des cellules à phosphoryler les tyrosines de ces deux sites NxxY est une condition nécessaire à la cellule pour réagir aux contraintes mécaniques imposées par l'environnement et pour moduler ces forces. La question suivante a donc été : quel est la kinase responsable de la phosphorylation des sites d'interaction pour la taline et la kindline ? Pour cela, nous avons décidé d'utiliser des drogues inhibant les kinase FAK, SFK, et Syk importantes dans les plaques et dont les fonctions précises dans la mécanotransduction sont toujours discutés[82].



CHAPITRE 4. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

4.3.3 SFK, régulateur de la mobilité de $\beta 3$?

Une approche pharmacologique nous a permis de tester l'effet de ses kinases sur la mobilité de $\beta 3$ -GFP.

Une expérience contrôle en utilisant du diméthylsulfoxyde (DMSO) a été faite lors de chaque expérience, le DMSO n'ayant aucun effet sur la cellule. L'inhibiteur a été mis dans le milieu de culture après 3h d'adhérence, puis laissé à 37°C, 5% CO₂ pendant 1h. L'inhibiteur était également présent dans le milieu d'observation utilisé sur le microscope.

Des drogues ayant une action spécifique sur les Focal Adhesion Kinase et les protéines de la famille de Src ont été utilisées.

Pour inhiber l'action de FAK, nous avons utilisé une concentration à 10 μ M de FAK inhibitor PF S2 (Tocris). A cette concentration, les plaques $\beta 3$ -GFP apparaissent moins brillantes et moins étendues que pour le type sauvage (Figure 4.19). Le signal est cependant suffisant pour effectuer des mesures de tICS. Les résultats nous montrent que l'inhibition de FAK n'affectent pas les temps de résidence de $\beta 3$ -GFP mais la morphologie des plaques. On observe dans ces cellules la même hiérarchie que pour le type sauvage, nous permettant de conclure que FAK ne semble pas être la kinase responsable de la phosphorylation des sites de liaison de la taline et de la kindline.

Pour inhiber les kinases de la famille de Src, nous avons utilisé du PP2³ à 10 μ M (Tocris). Cependant, l'analyse des temps de résidence nous montre une perte de la différence de comportement entre les différentes régions, avec des temps de résidence similaires au temps obtenus dans le cas de la mutation du site de liaison à la kindline. Notre conclusion est donc que SFK⁴ est la kinase responsable de la phosphorylation du site de liaison de la kindline, permettant à l'intégrine $\beta 3$ de moduler son temps d'interaction avec les protéines régulatrices de l'activation des intégrines[82, 117].

Les kinases SFK semblent phosphoryler ce site distal, renforçant leur importance dans la mécanorégulation. SFK semble donc moduler la mobilité

3. Protein Phosphatase 2

4. Src family kinase

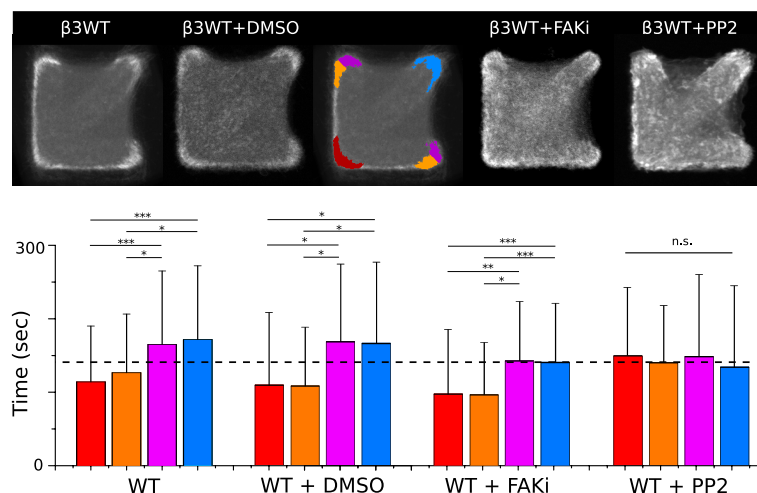


FIGURE 4.19: **SFK est la kinase responsable de la phosphorylation du site NxxY distal (kindline)** En comparant les temps de résidence des intégrines dans chaque région entre $\beta 3$ -GFP + DMSO et $\beta 3$ -GFP + PP2 (Src inhibitor), on remarque une hausse du temps de résidence des intégrines dans les régions de faibles tensions, comportement proche du comportement de l'intégrine muté sur son site NxxY distal. L'ajout d'un inhibiteur de FAK ne semblent avoir aucune effet sur la modulation de la dynamique de $\beta 3$ -GFP en réponse aux contraintes mécaniques. Cependant, on peut voir sur les images moyennes que les cellules ne forment pas de jolies adhérences focales.

de l'intégrine $\beta 3$ -GFP, ouvrant ainsi une nouvelle voie possible de la mécano-transduction.

Les expériences visant à inhiber la kinase Syk n'ont pas pu être faite. Même à une concentration correspondant à l'IC₅₀⁵, aucune adhérence n'a été observé sur plusieurs centaine de cellules. Seules les résultats pour FAK et Src sont donc montrés.

5. Concentration réduisant l'effet de la protéine de 50%

Residence Time (sec)	Hors plaques	Rouge	Orange	Magenta	Bleue
$\beta 1$ WT (N=41)	57 \pm 20	148 \pm 91	151 \pm 104	144 \pm 107	158 \pm 119
$\beta 3$ WT (N=52)	50 \pm 27	114 \pm 76	126 \pm 80	165 \pm 100	171 \pm 100
$\beta 3$ ECD- $\beta 1$ CD (N=33)	62 \pm 31	145 \pm 82	144 \pm 97	152 \pm 117	152 \pm 93
$\beta 1$ ECD- $\beta 3$ CD (N=19)	40 \pm 19	91 \pm 58	96 \pm 71	127 \pm 70	149 \pm 97
$\beta 3$ WT (N=52)	50 \pm 27	114 \pm 76	126 \pm 80	165 \pm 100	171 \pm 100
$\beta 3$ N304T (N=36)	42 \pm 18	95 \pm 92	107 \pm 82	136 \pm 107	150 \pm 110
$\beta 3$ D748A+E751A (N=20)	38 \pm 14	97 \pm 89	94 \pm 63	167 \pm 101	169 \pm 99
$\beta 3$ Y772A (N=20)	37 \pm 16	42 \pm 21	45 \pm 23	47 \pm 23	39 \pm 27
$\beta 3$ Y784A (N=10)	38 \pm 11	44 \pm 20	43 \pm 12	47 \pm 13	45 \pm 22
$\beta 3$ Y772F (N=25)	43 \pm 21	129 \pm 91	121 \pm 78	131 \pm 82	129 \pm 90
$\beta 3$ Y784F (N=39)	48 \pm 22	164 \pm 81	175 \pm 92	179 \pm 92	177 \pm 85
$\beta 3$ WT (N=52)	50 \pm 27	114 \pm 76	126 \pm 80	165 \pm 100	171 \pm 100
$\beta 3$ +DMSO (N=20)	40 \pm 32	109 \pm 79	108 \pm 77	161 \pm 73	159 \pm 65
$\beta 3$ +FAKi (N=16)	45 \pm 21	90 \pm 34	88 \pm 26	141 \pm 46	143 \pm 59
$\beta 3$ +PP2 (N=18)	68 \pm 41	150 \pm 114	141 \pm 90	149 \pm 106	134 \pm 83

TABLE 4.2: Tableau récapitulatif des temps de résidence pour les différents phénotypes.

Chapitre 5

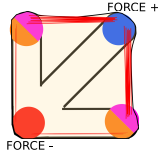
Conclusion et perspectives

Dans cette thèse, je me suis intéressé à la dynamique des intégrines en réponse aux contraintes mécaniques imposées par l’environnement. Pour cela, nous avons combiné plusieurs techniques originales.

La conception de micromotifs sur verre et le développement d’une nouvelle technique pour faire des micromotifs sur gel nous ont permis de contrôler la forme de la cellule, son architecture d’acto-myosine et la distribution des forces à l’intérieur de la cellule. Les mesures de forces de traction ont permis de confirmer un écart significatif de tension entre les différentes régions cellulaires.

Dans ces expériences, la cellule adapte son architecture d’actine et sa forme au micromotif. La modulation des niveaux de forces de traction est donc une réponse à la géométrie imposée. Contrairement aux expériences visant à utiliser des pinces optiques pour exercer des forces sur des nanobilles d’or adhérant à la cellule[115, 137], nous observons ici des forces exercées à l’équilibre par la cellule et ne proviennent pas d’une perturbation dynamique effectuée par un utilisateur extérieur. Nos expériences explorent donc un aspect différent de la mécanotransduction et favorisent une vision statistique sur des structures adhésives comparables.

Les immunomarquages sur verre et sur gel ainsi que les mesures d’AFM nous laissent penser que nous conservons la modulation des forces de trac-



CHAPITRE 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

tions sur verre. La combinaison des micromotif sur verre avec des techniques de corrélation d'images ont permis d'étudier la dynamique de $\beta 1$ -GFP et $\beta 3$ -GFP dans ces différentes régions et d'observer une différence de comportement entre ces deux intégrines. Tout comme le sous-entendaient les résultats présentés récemment par Schiller[121], $\beta 1$ et $\beta 3$ réagissent différemment aux tensions. $\beta 1$ est insensible à la tension et ne modifie pas sa dynamique en fonction des forces de traction, mais augmente cependant sa concentration dans les régions sous forte tension. $\beta 3$ est sensible au niveau de tension et est capable de modifier son temps de résidence entre les différentes régions, appuyant l'idée de régulateur de la tension de part sa capacité à modifier son temps d'interaction avec la matrice extra-cellulaire et les protéines adaptatrices se trouvant dans le cytoplasme. Dans les régions de forte tension, $\beta 3$ augmente son temps de résidence et le diminue dans les zones de faibles tensions. En partant de l'hypothèse selon laquelle les intégrines se déplacent par paquet, cela peut avoir comme effet d'augmenter le nombre d'événements d'activations ou de rendre la structure instable et diminuer ainsi la capacité de la plaque focale à transmettre des forces de traction sur le substrat[54].

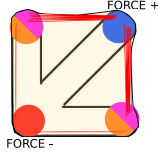
Ces observations peuvent être comparées aux observations faite par Ballestrem & al [8] qui ont conclu que les intégrines $\beta 3$ semblaient modifier leur mobilité en fonction de la densité d'intégrine $\beta 3$ -GFP dans les adhérences. Leur conclusion était qu'une plaque de haute densité, assimilée à une plaque sous forte tension avait un temps de résidence court comparé à une plaque de faible densité, assimilée à une plaque sous faible tension, ayant un temps de résidence long. Nos résultats semblent opposés à ces conclusions. Il est cependant important de noter plusieurs différences entre nos expériences. Leur idée de départ était d'utiliser l'intensité de fluorescence de l'adhérence pour la relier à une valeur de tension. Cette pratique a été depuis remise en cause et il a été démontré qu'il n'est pas possible de corréler l'intensité d'une plaque à une valeur de tension[131]. Par exemple, nos mesures de tICS sur $\beta 3$ -GFP ainsi que l'image moyenne des cellules sur micromotif en flèche semble indiquer une concentration plus importante des intégrines $\beta 3$ -GFP dans les

zones de faibles tensions. De plus, dans leur expérience, la cellule étant sur un substrat homogène, elle est capable de migrer. Les expériences de FRAP se faisant sur une dizaine de minute, il est possible d’observer un phénomène de glissement de la plaque $\beta 3$ à l’arrière de la cellule se traduisant par une altération des données sur le retour de fluorescence qui pourrait être du à la fois à un échange de molécule ainsi qu’à la transformation de la structure adhésive dans sa globalité. Enfin, les courbes de FRAP ne semble pas avoir été effectué sur un nombre important de cellules et semblent comparer des adhérences à des stades de maturations différents.

Nous avons prouvé ensuite par l’utilisation des intégrines chimères que la partie cytoplasmique était responsable de la modulation de la mobilité de $\beta 3$. Nous nous sommes donc intéressés à l’interaction permettant à $\beta 3$ de moduler son temps de résidence en réponse aux contraintes mécaniques. Deux mutations semblent être importantes dans la régulation de la dynamique de $\beta 3$, donnant chacun des résultats différents.

La mutation sur le site NxxY proximal interagissant avec la taline, mutation empêchant la phosphorylation du site et donc le désengagement stimulé de l’intégrine, altérant la capacité des cellules à modifier le temps de résidence de l’intégrine $\beta 3$ en fonction de la force. Il serait cependant intéressant de voir l’impact de cette mutation sur la distribution de $\beta 1$. Les valeurs de temps de résidence observées semblent moyennées autour d’une valeur comprise entre les deux temps de résidence extrêmes en cas de forte et faible tension sur le type sauvage.

Notre hypothèse est que cette modification génétique n’altère pas la capacité de l’intégrine à s’engager ou se désengager de l’adhérence focale. En partant des observations faite par Rossier & al[116] sur les différents régimes de diffusion de $\beta 3$ (diffusive, confinée, immobile), en supposant que nous n’avons pas accès aux intégrines diffusant librement dû au limitation technique de l’imagerie utilisée, un modèle simple basé sur un ratio populationnel entre les deux espèces diffusant de manière confinée et immobile nous permettrait d’expliquer les résultats. Dans une région sous faible tension,



CHAPITRE 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

la proportion d'intégrine $\beta 3$ -WT diffusant de manière confinée serait plus importante que celles des intégrines immobiles, donnant un temps de résidence apparent faible (Figure 5.2.B.). Dans une région sous forte tension, la proportion d'intégrine $\beta 3$ -WT diffusant de manière confinée serait moins importante que celles des intégrines immobiles, donnant un temps de résidence apparent grand (Figure 5.2.B). Cela nous dit que les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ semblent se comporter différemment en réponse aux contraintes mécaniques. Cela illustre leur rôle distinct dans l'établissement des forces de traction. $\beta 3$ -GFP module sa dynamique en fonction du niveau de tension et la mutation de l'intégrine sur le site proximal affecte cette mécanosensibilité et régulation de l'homéostasie tensionnelle[93] (Figure 5.1).

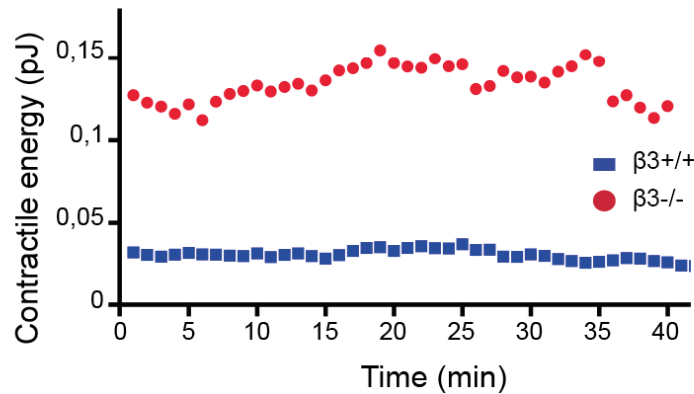


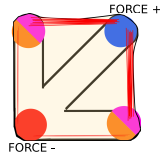
FIGURE 5.1: $\beta 3$ est nécessaire pour réguler dynamiquement la contrainte mécanique appliquée sur un substrat. Force de traction émise par des cellules MEF sur gel mou de 5kPa dans le temps. La suppression de l'intégrine $\beta 3$ dans les cellules a pour effet d'augmenter le niveau de force exercée par la cellule et de perturber la régulation de ces forces par une augmentation de la variation de l'énergie générée par la cellule dans le temps.

L'influence des niveaux de forces de traction sur la distribution des régimes de diffusion pour l'intégrine mutée sur le site proximal serait alors perdue, donnant dans toutes les régions de la cellule un temps de résidence moyen et en terme de force, une énergie contractile comparable aux cellules sauvages. Selon notre hypothèse, la mutation sur la tyrosine du site proximal

ne modifie pas la capacité des intégrines à diffuser dans une configuration immobile ou confinée, mais ne permet pas de réguler son temps de résidence en réponse aux contraintes mécaniques. Une cellule possédant cette mutation devrait avoir une migration très perturbée voir nulle comparée à une cellule sauvage, la cellule étant incapable de stabiliser dans une région ces adhérences pour exercer plus de force de traction et se déplacer (Figure 5.2.C).

La mutation sur le site NxxY distal interagissant avec la kindline a un effet partiellement semblable à la mutation sur le site proximal, du fait que l'intégrine est à nouveau incapable de réagir au niveau de force de traction en modifiant son temps de résidence. Dans le cas de ce mutant, tout les temps de résidence sont augmentés (Figure 5.2.C). En terme de force, les expériences visant à mesurer l'énergie contractile nous montre que cette mutation ne restaure pas l'activité de $\beta 3$ -WT, c'est-à-dire sa capacité à réguler négativement l'intégrine $\beta 1$, résultant en une augmentation globale de l'énergie contractile[93]. En se re-basant sur notre hypothèse précédente, nous pouvons imaginer un scénario pour lequel l'augmentation du temps de résidence de $\beta 3$ se traduit par une hausse de la stabilité des plaques d'adhérence et donc une force de traction plus importante, corrélée avec une diminution de la concentration en intégrine $\beta 3$ dans les plaques d'adhérences et une hausse de concentration en intégrine $\beta 1$. La capacité des cellules à phosphoryler le site NxxY distal est donc l'élément clé permettant à la cellule de déstabiliser l'adhérence focale, limitant la concentration en intégrine $\beta 1$ et donc le niveau de force de traction pouvant être exercée, phosphorylation qui semble être gouvernée par les kinases de la famille de Src, kinases n'interagissant qu'avec $\beta 3$ et non $\beta 1$ [5].

Cependant, la compréhension sur le rôle de la taline et de la kindline et l'impact de leur concentration en fonction du niveau de tension reste peu claire. L'étude de la dynamique et de la concentration par RICS de la taline et de la kindline dans des cellules sauvages, dans des cellules mutées sur l'intégrine $\beta 3$ ou en absence de l'intégrine $\beta 3$ sur un motif en flèche permettrait de comprendre l'impact de la taline et de la kindline sur la mécanotransduction.



CHAPITRE 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

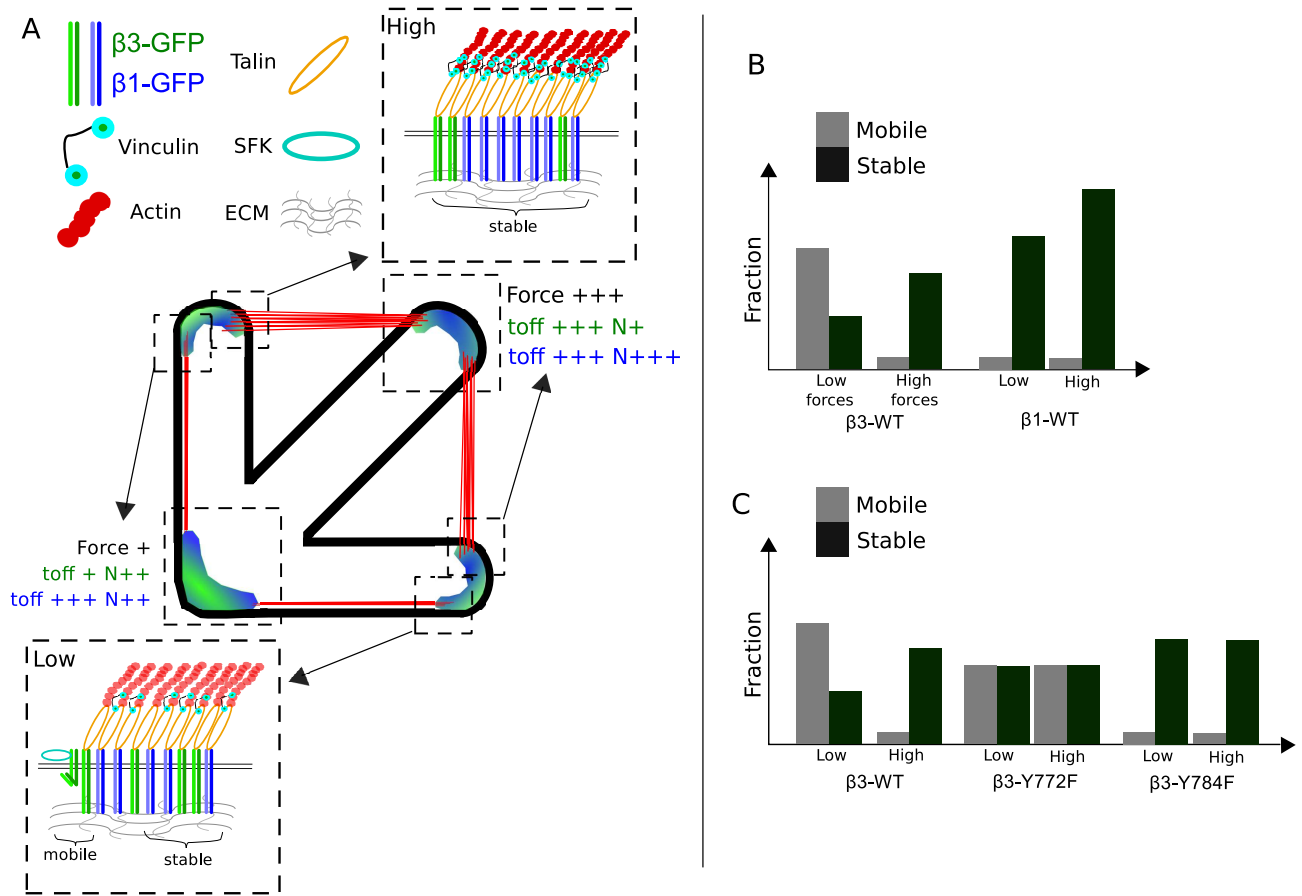


FIGURE 5.2: Figure Bilan et hypothèse sur la distribution des régimes diffusif pour expliquer les temps de résidence mesurés sur les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$. A. Figure illustrant le comportement des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans les adhérences focales pour une cellule adhérent sur un motif en flèche. B. Distribution des intégrines $\beta 1$ -GFP et $\beta 3$ -GFP selon un critère de mobilité (stable ou immobile) dans les régions de faibles et de fortes tensions. C. Distribution selon les mêmes critères pour l'intégrine $\beta 3$ -WT comparée à l'intégrine $\beta 3$ mutée sur le site NxxY sur le site proximal ou distal.

Il apparaît que ces interactions dynamiques sont régulées par SFK. Le lien entre les SFKs et la mécanotransduction est ici parfaitement illustré. Il apparaît plus que nécessaire d'étudier le comportement de $\beta 3$ dans le cas où son interaction avec SFK serait bloquée. Comment ces SFKs sont activés en réponse à des modulations de tensions ?

Il serait ainsi intéressant d'étudier la dynamique et la concentration de la tyrosine phosphatase transmembranaire RPTP α , protéine activateur de Src et Fyn, en réponse aux contraintes mécaniques imposées. RPTP α est connue pour colocaliser avec les intégrines $\alpha v\text{-}\beta 3$ et participer à la création des complexes focaux et leur renforcement en plaques d'adhérences[136]. Il a de plus été montré que la présence de RPTP α était nécessaire à la cellule pour répondre aux contraintes mécaniques imposées par l'environnement.

Ces travaux ouvrent également des voies vers l'étude de la dynamique et la concentration des SFKs. Le développement récent dans l'équipe MOTIV et DySAD de technique d'opto-génétique ouvre un nouvel horizon aux conclusions faites dans cette étude. L'opto-génétique permet de forcer, de manière dynamique, l'interaction entre deux molécules transformées et ainsi de modifier le comportement de la cellule[76, 133] (Figure 5.3). En forçant l'interaction entre SFK et l'intégrine $\beta 3$, serait-il possible sur un substrat homogène de recruter Src vers un pôle de la cellule et ainsi contrôler les propriétés mécaniques des sites adhésifs ?

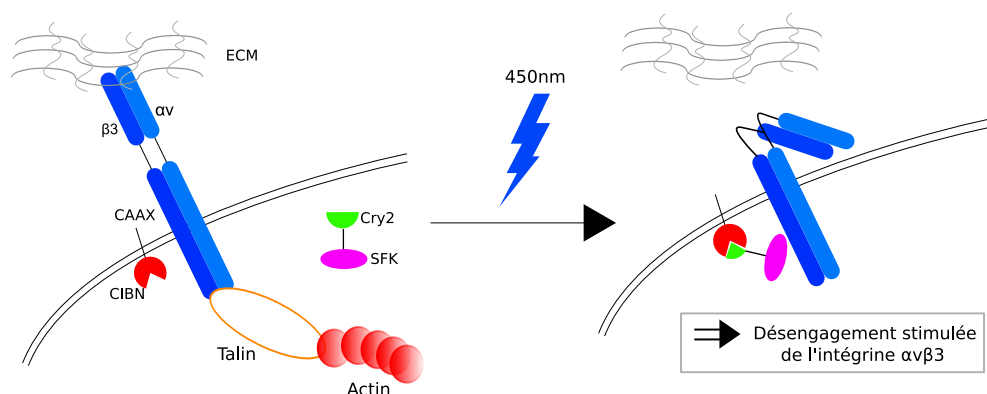
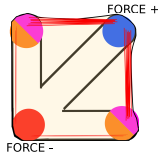


FIGURE 5.3: Système optogénétique ciblé sur SFK. L'illumination d'une région à 450nm aura pour effet de recruter Src près d'une adhérence et de stimulée le désengagement de l'intégrine $\beta 3$.

Pour conclure, j'ai démontré ici l'importance de l'étude de la dynamique des intégrines dans le processus de mécanotransduction. Il apparait de manière clair que l'intégrine $\beta 3$ module son temps de résidence dans les plaques en fonction du niveau de tension et que cette modulation de tension se fait



CHAPITRE 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

via la phosphorylation des sites NxxY proximal et distal par les SFKs. La mutation sur le site distal semble bloquer l'intégrine dans un régime d'immobilisation, rendant l'intégrine $\beta 3$ incapable de réguler son temps de résidence, ainsi que de réguler l'activité de $\beta 1$ et la production de force. La mutation sur le site proximal ne semble pas affecter la capacité de l'intégrine à modifier son temps de résidence, mais rend l'intégrine insensible aux propriétés mécaniques de l'environnement, car la cellule est incapable d'immobiliser $\beta 3$ dans les régions de fortes tensions et de laisser diffuser $\beta 3$ dans les régions de faibles tensions comme dans le cas de la cellule $\beta 3$ -GFP WT. Ces résultats semblent indiquer pour la première fois un lien direct entre la mobilité des intégrines, les forces de traction et une régulation par les kinases SFKs directement sur les intégrines.

Bibliographie

- [1] ADAMS, J. C. Cellular and Molecular Life Sciences Cell-matrix contact structures. *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (2001), 371–392.
- [2] ALBIGÈS-RIZO, C., FRACHET, P., AND BLOCK, M. R. Down regulation of talin alters cell adhesion and the processing of the alpha 5 beta 1 integrin. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 1 (1995), 3317–3329.
- [3] ANTHIS, N. J., HALING, J. R., OXLEY, C. L., MEMO, M., WEGENER, K. L., LIM, C. J., GINSBERG, M. H., AND CAMPBELL, I. D. Beta integrin tyrosine phosphorylation is a conserved mechanism for regulating talin-induced integrin activation. *J. Biol. Chem.* 284, 52 (Dec. 2009), 36700–10.
- [4] ANTHIS, N. J., WEGENER, K. L., YE, F., KIM, C., GOULT, B. T., LOWE, E. D., VAKONAKIS, I., BATE, N., CRITCHLEY, D. R., GINSBERG, M. H., AND CAMPBELL, I. D. The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *EMBO J.* 28, 22 (2009), 3623–3632.
- [5] ARIAS-SALGADO, E. G., LIZANO, S., SARKAR, S., BRUGGE, J. S., GINSBERG, M. H., AND SHATTIL, S. J. Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 23 (2003), 13298–13302.
- [6] ARTHUR, W. T., PETCH, L. A., AND BURRIDGE, K. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr. Biol.* 10, 12 (2000), 719–722.
- [7] BALABAN, N. Q., SCHWARZ, U. S., RIVELINE, D., GOICHBERG, P., TZUR, G., SABANAY, I., MAHALU, D., SAFRAN, S., BERSHADSKY, A., ADDADI, L., AND GEIGER, B. Force and focal adhesion assembly : a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat. Cell Biol.* 3, May (2001).
- [8] BALLESTREM, C., HINZ, B., IMHOF, B. A., AND WEHRLE-HALLER, B. Marching at the front and dragging behind : differential

- alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J. Cell Biol.* 155, 7 (Dec. 2001), 1319–32.
- [9] BARCZYK, M., CARRACEDO, S., AND GULLBERG, D. Integrins. *Cell Tissue Res.* 339, 1 (Jan. 2010), 269–80.
- [10] BARRETT, A., PELLET-MANY, C., ZACHARY, I. C., EVANS, I. M., AND FRANKEL, P. P130Cas : A key signalling node in health and disease. *Cell. Signal.* 25, 4 (2013), 766–777.
- [11] BENINGO, K. A., DEMBO, M., KAVERINA, I., SMALL, J. V., AND WANG, Y. L. Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J. Cell Biol.* 153, 4 (2001), 881–887.
- [12] BERSHADSKY, A., CHAUSOVSKY, A., BECKER, E., LYUBIMOVA, A., AND GEIGER, B. Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr. Biol.* 6, 10 (1996), 1279–1289.
- [13] BLANCHON, L., BOUJEMAA-PATERSKI, R., SYKES, C., AND PLASTINO, J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* 94, 1 (2014), 235–63.
- [14] BLEDZKA, K., BIALKOWSKA, K., NIE, H., QIN, J., BYZOVA, T., WU, C., PLOW, E. F., AND MA, Y. Q. Tyrosine phosphorylation of integrin beta3 regulates kindlin-2 binding and integrin activation. *J. Biol. Chem.* 285, 40 (2010), 30370–30374.
- [15] BOUVARD, D., BRAKEBUSCH, C., GUSTAFSSON, E., ASZÓDI, A., BENGTSSON, T., BERNA, A., AND FÄSSLER, R. Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ. Res.* 89, 3 (2001), 211–223.
- [16] BOVE, J., VAILLANCOURT, B., KROEGER, J., HEPLER, P. K., WISEMAN, P. W., AND GEITMANN, A. Magnitude and direction of vesicle dynamics in growing pollen tubes using spatiotemporal image correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching. *Plant Physiol.* 147, 4 (2008), 1646–1658.
- [17] BROWN, C., DALAL, R., B. HEBERT, DIGMAN, M., HORWITZ, A., AND GRATTON, E. Raster image correlation spectroscopy (RICS) for measuring fast protein dynamics and concentrations with a commercial laser scanning confocal microscope. *J. Microsc.* 229, 0 1 (2008), 78–91.
- [18] BROWN, C. M., HEBERT, B., KOLIN, D. L., ZARENO, J., WHITMORE, L., HORWITZ, A. R., AND WISEMAN, P. W. Probing the integrin-actin linkage using high-resolution protein velocity mapping. *J. Cell Sci.* 119, Pt 24 (2006), 5204–5214.

- [19] BROWN, N. H., GREGORY, S. L., RICKOLL, W. L., FESSLER, L. I., PROUT, M., WHITE, R. A. H., AND FRISTROM, J. W. Talin is essential for integrin function in *Drosophila*. *Dev. Cell* 3, 4 (2002), 569–579.
- [20] BURRIDGE, K., TURNER, C. E., AND ROMER, L. H. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix : A role in cytoskeletal assembly. *J. Cell Biol.* 119, 4 (1992), 893–903.
- [21] BUTLER, J. P., TOLIĆ-NØRRELYKKE, I. M., FABRY, B., AND FREDBERG, J. J. Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, 3 (2002), C595–C605.
- [22] CALDERWOOD, D. A., AND GINSBERG, M. H. Talin forges the links between integrins and actin. *Nat. Cell Biol.* 5, 8 (2003), 694–697.
- [23] CANEL, M., SERRELS, A., FRAME, M. C., AND BRUNTON, V. G. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J. Cell Sci.* 126, 2 (2013), 393–401.
- [24] CARNESECCHI, J., MALBOUYRES, M., DE METS, R., BALLAND, M., BEAUCHEF, G., VIÉ, K., CHAMOT, C., LIONNET, C., RUGGIERO, F., AND VANACKER, J.-M. Estrogens Induce Rapid Cytoskeleton Re-Organization in Human Dermal Fibroblasts via the Non-Classical Receptor GPR30. *PLoS One* 10, 3 (2015), e0120672.
- [25] CARY, L. A., CHANG, J. F., AND GUAN, J. L. Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 7 (1996), 1787–1794.
- [26] CASE, L. B., BAIRD, M. A., SHTENGEL, G., CAMPBELL, S. L., HESS, H. F., DAVIDSON, M. W., AND WATERMAN, C. M. Molecular mechanism of vinculin activation and nanoscale spatial organization in focal adhesions. *Nat. Cell Biol.* 17, 7 (2015).
- [27] CAVALCANTI-ADAM, E. A., VOLBERG, T., MICOULET, A., KESSLER, H., GEIGER, B., AND SPATZ, J. P. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys. J.* 92, 8 (2007), 2964–2974.
- [28] CHARDIN, P. GTPase regulation : Getting aRnd rock and Rho inhibition. *Curr. Biol.* 13, 18 (2003), 702–704.
- [29] CHEN, C. S., MRKSICH, M., HUANG, S., WHITESIDES, G. M., AND INGBER, D. E. Geometric control of cell life and death. *Science* 276, 5317 (1997), 1425–1428.

- [30] CHRZANOWSKI-WODNICKA, M., AND BURRIDGE, K. Rho-stimulated Contractility Drives the Formation of Stress Fibers and Focal Adhesions Magdalena. *J. Cell Biol.* 133, 6 (1996), 1403–1415.
- [31] COX, T. R., AND ERLER, J. T. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix : implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis. Model. Mech.* 4, 2 (2011), 165–178.
- [32] CRITCHLEY, D. R., AND GINGRAS, A. R. Talin at a glance. *J. Cell Sci.* 121, Pt 9 (2008), 1345–1347.
- [33] DAI, Y., QI, L., ZHANG, X., LI, Y., CHEN, M., AND ZU, X. CrkI and p130(Cas) complex regulates the migration and invasion of prostate cancer cells. *Cell Biochem. Funct.* 29, 8 (2011), 625–9.
- [34] DAVENPORT, R. W., DOU, P., REHDER, V., AND KATER, S. A sensory role for neuronal growth cone filopodia. *Nature* 361, 6414 (1993), 721–4.
- [35] DE BRABANDER, M., NUYDENS, R., ISHIHARA, A., HOLIFIELD, B., JACOBSON, K., AND GEERTS, H. Lateral diffusion and retrograde movements of individual cell surface components on single motile cells observed with nanovid microscopy. *J. Cell Biol.* 112, 1 (1991), 111–124.
- [36] DEDHAR, S., AND HANNIGAN, G. E. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 5 (1996), 657–669.
- [37] DEMBO, M., AND WANG, Y. L. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys. J.* 76, 4 (1999), 2307–2316.
- [38] DESTAING, O., BLOCK, M. R., PLANUS, E., AND ALBIGES-RIZO, C. Invadosome regulation by adhesion signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 5 (2011), 597–606.
- [39] DIGMAN, M. A., BROWN, C. M., HORWITZ, A. R., MANTULIN, W. W., AND GRATTON, E. Paxillin dynamics measured during adhesion assembly and disassembly by correlation spectroscopy. *Biophys. J.* 94, 7 (Apr. 2008), 2819–31.
- [40] DIGMAN, M. A., AND GRATTON, E. Analysis of diffusion and binding in cells using the RICS approach. *Microsc. Res. Tech.* 72, 4 (Apr. 2009), 323–32.
- [41] DIGMAN, M. A., SENGUPTA, P., WISEMAN, P. W., BROWN, C. M., HORWITZ, A. R., AND GRATTON, E. Fluctuation correlation spectroscopy with a laser-scanning microscope : exploiting the hidden time structure. *Biophys. J.* 88, 5 (2005), L33–L36.

- [42] DISCHER, D. E., JANMEY, P., AND WANG, Y.-L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* *310*, 5751 (Nov. 2005), 1139–43.
- [43] DUBIN-THALER, B., XENIAS, H. S., AND SHEETZ, M. P. Dynamic Phase Transitions in Cell Spreading. *Phys. Rev. Lett.* *93*, 10 (2004).
- [44] DUBIN-THALER, B. J., GIANNONE, G., DÖBEREINER, H.-G., AND SHEETZ, M. P. Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs. *Biophys. J.* *86*, 3 (Mar. 2004), 1794–806.
- [45] DUMBAULD, D. W., LEE, T. T., SINGH, A., SCRIMGEOUR, J., GERSBACH, C. A., ZAMIR, E. A., FU, J., CHEN, C. S., CURTIS, J. E., CRAIG, S. W., AND GARCÍA, A. J. How vinculin regulates force transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 24 (June 2013), 9788–93.
- [46] ENGLER, A. J., SEN, S., SWEENEY, H. L., AND DISCHER, D. E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* *126*, 4 (Aug. 2006), 677–89.
- [47] ENOMOTO, T. Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions in cultured cells : possible involvement of the rho signal cascade. *Cell Struct. Funct.* *21*, 5 (1996), 317–326.
- [48] FINCHAM, V. J., AND FRAME, M. C. The catalytic activity of Src is dispensable for translocation to focal adhesions but controls the turnover of these structures during cell motility. *EMBO J.* *17*, 1 (1998), 81–92.
- [49] FINER, J. T., SIMMONS, R. M., AND SPUDICH, J. A. Single myosin molecule mechanics : piconewton forces and nanometre steps. *Nature* *368*, March (1994), 113–119.
- [50] GEIGER, B. A Role for p130Cas in Mechanotransduction. *Cell* *127*, 5 (2006), 879–881.
- [51] GEIGER, B., AND BERSHADSKY, A. Exploring the neighborhood : Adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell* *110*, 2 (2002), 139–142.
- [52] GELLES, J., SCHNAPP, B. J., AND SHEETZ, M. P. Tracking kinesin-driver movements with nanometre-scale precision. *Nature* *331* (1988), 403–405.
- [53] GIANNONE, G. Super-resolution links vinculin localization to function in focal adhesions. *Nat. Cell Biol.* *17*, 7 (2015), 845–847.
- [54] GIANNONE, G., MÈGE, R. M., AND THOUMINE, O. Multi-level molecular clutches in motile cell processes. *Trends Cell Biol.* *19*, 9 (2009), 475–486.

- [55] GIANNONE, G., AND SHEETZ, M. P. Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways. *Trends Cell Biol.* 16, 4 (2006), 213–223.
- [56] GOKSOY, E., MA, Y.-Q., WANG, X., KONG, X., PERERA, D., PLOW, E. F., AND QIN, J. Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation. *Mol. Cell* 31, 1 (July 2008), 124–33.
- [57] GUPTON, S. L., AND WATERMAN-STORER, C. M. Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell* 125, 7 (June 2006), 1361–74.
- [58] HARBURGER, D. S., BOUAOUINA, M., AND CALDERWOOD, D. A. Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects. *J. Biol. Chem.* 284, 17 (2009), 11485–11497.
- [59] HARBURGER, D. S., AND CALDERWOOD, D. A. Integrin signalling at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 9 (Apr. 2009), 1472–1472.
- [60] HE, Y., ESSER, P., HEINEMANN, A., BRUCKNER-TUDERMAN, L., AND HAS, C. Kindlin-1 and -2 have overlapping functions in epithelial cells : Implications for phenotype modification. *Am. J. Pathol.* 178, 3 (2011), 975–982.
- [61] HE, Y., ESSER, P., SCHACHT, V., BRUCKNER-TUDERMAN, L., AND HAS, C. Role of kindlin-2 in fibroblast functions : implications for wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 131, 1 (Jan. 2011), 245–56.
- [62] HEBERT, B., COSTANTINO, S., AND WISEMAN, P. W. Spatiotemporal image correlation spectroscopy (STICS) theory, verification, and application to protein velocity mapping in living CHO cells. *Biophys. J.* 88, 5 (May 2005), 3601–14.
- [63] HOFFMAN, B. D., GRASHOFF, C., AND SCHWARTZ, M. A. Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature* 475, 7356 (2011), 316–323.
- [64] HSU, T.-P., AND COHEN, C. Observations on the structure of a polyacrylamide gel from electron micrographs. *Polymer (Guildf)*. 25 (1984), 1419–1423.
- [65] HU, K., JI, L., APPELEGATE, K. T., DANUSER, G., AND WATERMAN-STORER, C. M. Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Science (80-.)*. 315, 5808 (2007), 111–115.
- [66] HUMPHRIES, J. D., WANG, P., STREULI, C., GEIGER, B., HUMPHRIES, M. J., AND BALLESTREM, C. Vinculin controls focal adhe-

- sion formation by direct interactions with talin and actin. *J. Cell Biol.* 179, 5 (Dec. 2007), 1043–57.
- [67] ILIĆ, D., FURUTA, Y., KANAZAWA, S., TAKEDA, N., SOBUE, K., NAKATSUJI, N., NOMURA, S., FUJIMOTO, J., OKADA, M., AND YAMAMOTO, T. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice., 1995.
- [68] IZZARD, C. A Precursor of the Focal Contact in Cultured Fibroblasts. *Cell Motil. Cytoskeleton* 10 (1988), 137–142.
- [69] KANCHANAWONG, P., SHTENGEL, G., PASAPERA, A. M., RAMKO, E. B., DAVIDSON, M. W., HESS, H. F., AND WATERMAN, C. M. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* 468, 7323 (2010), 580–584.
- [70] KARAKÖSE, E., SCHILLER, H. B., AND FÄSSLER, R. The kindlins at a glance. *J. Cell Sci.* 123, Pt 14 (2010), 2353–2356.
- [71] KASTANIS, G. J., HERNANDEZ-NAZARA, Z., NIETO, N., RINCÓN-SANCHEZ, A. R., POPRATILOFF, A., DOMINGUEZ-ROSALES, J. A., LECHUGA, C. G., AND ROJKIND, M. The role of dystroglycan in PDGF-BB-dependent migration of activated hepatic stellate cells/myofibroblasts. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 301, 3 (2011), G464–G474.
- [72] KATSUMI, A., ORR, A. W., TZIMA, E., AND SCHWARTZ, M. A. Integrins in Mechanotransduction. *J. Biol. Chem.* 279, 2 (2004), 12001–12004.
- [73] KATZ, B. Z., ZAMIR, E., BERSHADSKY, A., KAM, Z., YAMADA, K. M., AND GEIGER, B. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol. Biol. Cell* 11, 3 (2000), 1047–1060.
- [74] KAVERINA, I., KRYLYSHKINA, O., AND SMALL, J. V. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J. Cell Biol.* 146, 5 (1999), 1033–1043.
- [75] KAVERINA, I., KRYLYSHKINA, O., AND SMALL, J. V. Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 7 (2002), 746–761.
- [76] KENNEDY, M. J., HUGHES, R. M., PETEYA, L. A., SCHWARTZ, J. W., EHLERS, M. D., AND TUCKER, C. L. Rapid blue light induction of protein interaction in living cells. *Nat. Methods* 7, 12 (2010), 973–975.
- [77] KIM, D.-H., AND WIRTZ, D. Focal adhesion size uniquely predicts cell migration. *FASEB J.* (Dec. 2012), 1–11.

- [78] KLOSTER-LANDSBERG, M., HERBOMEL, G., WANG, I., DEROUARD, J., VOURC'H, C., USSON, Y., SOUCHIER, C., AND DELON, A. Cellular response to heat shock studied by multiconfocal fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* 103, 6 (Sept. 2012), 1110–9.
- [79] KOLIN, D. L., AND WISEMAN, P. W. Advances in image correlation spectroscopy : Measuring number densities, aggregation states, and dynamics of fluorescently labeled macromolecules in cells. *Cell Biochem. Biophys.* 49, 3 (2007), 141–164.
- [80] KOVÁCS, M., TÓTH, J., HETÉNYI, C., MÁLNÁSI-CSIZMADIA, A., AND SELLER, J. R. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J. Biol. Chem.* 279, 34 (2004), 35557–35563.
- [81] LARJAVA, H., PLOW, E. F., AND WU, C. Kindlins : essential regulators of integrin signalling and cell-matrix adhesion. *EMBO Rep.* 9, 12 (Dec. 2008), 1203–8.
- [82] LAW, D. A., NANNIZZI-ALAIMO, L., AND PHILLIPS, D. R. Outside-in Integrin Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* 271, 18 (1996), 10811–10815.
- [83] LEASK, A. Integrin $\beta 1$: A Mechanosignaling Sensor Essential for Connective Tissue Deposition by Fibroblasts. *Adv. wound care* 2, 4 (May 2013), 160–166.
- [84] LEGATE, K. R., AND FÄSSLER, R. Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *J. Cell Sci.* 122, Pt 2 (Jan. 2009), 187–98.
- [85] LELE, T. P., PENDSE, J., KUMAR, S., SALANGA, M., KARAVITIS, J., AND INGBER, D. E. Mechanical Forces Alter Zyxin Unbinding Kinetics Within Focal Adhesions of Living Cells. *J. Cell. Physiol.* 27, 2 (2006), 187–194.
- [86] LI, J., WANG, I., AND FAYER, M. D. Ultrafast to slow orientational dynamics of a homeotropically aligned nematic liquid crystal. *J. Phys. Chem. B* 109, 14 (2005), 6514–6519.
- [87] LINDER, S. Invadosomes at a glance. *J. Cell Sci.* 122, Pt 17 (Sept. 2009), 3009–13.
- [88] LO, C. M., WANG, H. B., DEMBO, M., AND WANG, Y. L. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* 79, 1 (2000), 144–152.
- [89] MANDAL, K., BALLAND, M., AND BUREAU, L. Thermoresponsive micropatterned substrates for single cell studies. *PLoS One* 7, 5 (Jan. 2012), e37548.

- [90] MANDAL, K., WANG, I., VITIELLO, E., ORELLANA, L. A. C., AND BALLAND, M. Cell dipole behaviour revealed by ECM sub-cellular geometry. *Nat. Commun.* 5 (Jan. 2014), 5749.
- [91] MEVES, A., STREMMEL, C., GOTTSCHALK, K., AND FÄSSLER, R. The Kindlin protein family : new members to the club of focal adhesion proteins. *Trends Cell Biol.* 19, 10 (2009), 504–513.
- [92] MIERKE, C. T., FREY, B., FELLNER, M., HERRMANN, M., AND FABRY, B. Integrin $\alpha 5 \beta 1$ facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *J. Cell Sci.* 124, Pt 3 (Feb. 2011), 369–83.
- [93] MILLOUD, R., DESTAING, O., DE METS, R., AND WANG, I. Involvement of $\beta 3$ integrin in spatio-temporal regulation of $\beta 1$ integrin driven force. *Submitted* (2015).
- [94] MONTANEZ, E., USSAR, S., SCHIFFERER, M., BÖSL, M., ZENT, R., MOSER, M., AND FÄSSLER, R. Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev.* 22, 10 (2008), 1325–1330.
- [95] NAKAMURA, K., YANO, H., UCHIDA, H., HASHIMOTO, S., SCHAEFER, E., AND SABE, H. Tyrosine phosphorylation of paxillin α is involved in temporospatial regulation of paxillin-containing focal adhesion formation and F-actin organization in motile cells. *J. Biol. Chem.* 275, 35 (2000), 27155–27164.
- [96] NUCKOLLS, G. H., ROMER, L. H., AND BURRIDGE, K. Microinjection of antibodies against talin inhibits the spreading and migration of fibroblasts. *J. Cell Sci.* 102 (Pt 4 (1992), 753–762.
- [97] OAKES, P. W., BANERJEE, S., MARCHETTI, M. C., AND GARDEL, M. L. Geometry Regulates Traction Stresses in Adherent Cells. *Biophys. J.* 107, 4 (Aug. 2014), 825–833.
- [98] OXLEY, C. L., ANTHIS, N. J., LOWE, E. D., VAKONAKIS, I., CAMPBELL, I. D., AND WEGENER, K. L. An integrin phosphorylation switch : the effect of beta3 integrin tail phosphorylation on Dok1 and talin binding. *J. Biol. Chem.* 283, 9 (Feb. 2008), 5420–6.
- [99] PALECEK, S. P. S., LOFTUS, J. C. J. J. C., GINSBERG, M. H. M., LAUFFENBURGER, D. D. A., HORWITZ, A. A. F., DESHPANDE, P. P., AND DANISHEFSKY, S. J. Integrin Ligand binding properties govern cell migration speed through cell Substratum adhesiveness. *Nature* 388, July (1997), 537–540.
- [100] PAPUSHEVA, E., AND HEISENBERG, C.-P. Spatial organization of adhesion : force-dependent regulation and function in tissue morphogenesis. *EMBO J.* 29, 16 (Aug. 2010), 2753–68.

- [101] PASAPERA, A. M., SCHNEIDER, I. C., RERICHA, E., SCHLAEPFER, D. D., AND WATERMAN, C. M. Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation. *J. Cell Biol.* 188, 6 (2010), 877–890.
- [102] PASZEK, M. J., ZAHIR, N., JOHNSON, K. R., LAKINS, J. N., ROZENBERG, G. I., GEFEN, A., REINHART-KING, C. A., MARGULIES, S. S., DEMBO, M., BOETTIGER, D., HAMMER, D. A., AND WEAVER, V. M. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8, 3 (2005), 241–254.
- [103] PETERSEN, N. O., HÖDDELIUS, P. L., WISEMAN, P. W., SEGER, O., AND MAGNUSSON, K. E. Quantitation of membrane receptor distributions by image correlation spectroscopy : concept and application. *Biophys. J.* 65, 3 (Sept. 1993), 1135–46.
- [104] PLOTNIKOV, S., PASAPERA, A., SABASS, B., AND WATERMAN, C. M. Force Fluctuations within Focal Adhesions Mediate ECM-Rigidity Sensing to Guide Directed Cell Migration. *Cell* 151, SUPPL. 1 (2012), 1513–1527.
- [105] PUKLIN-FAUCHER, E., AND SHEETZ, M. P. The mechanical integrin cycle. *J. Cell Sci.* 122, 4 (Feb. 2009), 575–575.
- [106] QIN, R., SCHMID, H., MUENZBERG, C., MAASS, U., KRNDIJA, D., ADLER, G., SEUFFERLEIN, T., LIEDERT, A., IGNATIUS, A., OSWALD, F., EISELER, T., AND VON WICHERT, G. Phosphorylation and turnover of paxillin in focal contacts is controlled by force and defines the dynamic state of the adhesion site. *Cytoskeleton* (2015).
- [107] RAFTOPOULOU, M., AND HALL, A. Cell migration : Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.* 265, 1 (2004), 23–32.
- [108] RAHMOUNI, S., LINDNER, A., RECHENMACHER, F., NEUBAUER, S., SOBAHI, T. R. A., KESSLER, H., CAVALCANTI-ADAM, E. A., AND SPATZ, J. P. Hydrogel micropillars with integrin selective peptidomimetic functionalized nanopatterned tops : a new tool for the measurement of cell traction forces transmitted through $\alpha v\beta 3$ - or $\alpha 5\beta 1$ -integrins. *Adv. Mater.* 25, 41 (Nov. 2013), 5869–74.
- [109] RAM, S., PRABHAT, P., CHAO, J., WARD, E. S., AND OBER, R. J. High accuracy 3D quantum dot tracking with multifocal plane microscopy for the study of fast intracellular dynamics in live cells. *Biophys. J.* 95, 12 (2008), 6025–6043.
- [110] REVACH, O.-Y., WEINER, A., RECHAV, K., SABANAY, I., LIVNE, A., AND GEIGER, B. Mechanical interplay between invadopodia and the nucleus in cultured cancer cells. *Sci. Rep.* 5 (Jan. 2015), 9466.

- [111] REYMANN, A.-C., BOUJEMAA-PATERSKI, R., MARTIEL, J.-L., GUÉRIN, C., CAO, W., CHIN, H., THÉRY, M., AND BLANCHON, L. Actin network architecture can determine myosin motor activity. *Science* 336, 260678 (2012), 1310.
- [112] RIDLEY, A. J., SCHWARTZ, M. A., BURRIDGE, K., FIRTEL, R. A., GINSBERG, M. H., BORISY, G., PARSONS, J. T., AND HORWITZ, A. R. Cell migration : integrating signals from front to back. *Science* 302, 5651 (2003), 1704–1709.
- [113] RIO, A., PEREZ-JIMENEZ, R., LIU, R., ROCA-CUSACHS, P., FERNANDEZ, J. M., AND SHEETZ, M. P. Stretching Single Talin Rod. *Science* 323, January (2009), 638–641.
- [114] ROCA-CUSACHS, P., DEL RIO, A., PUKLIN-FAUCHER, E., GAUTHIER, N. C., BIAIS, N., AND SHEETZ, M. P. Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by -actinin triggers adhesion maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (Mar. 2013).
- [115] ROCA-CUSACHS, P., GAUTHIER, N. C., AND SHEETZ, M. P. Clustering of alpha 5 beta 1 integrins determines adhesion strength whereas alpha v beta 3 and talin enable mechanotransduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 38 (2009).
- [116] ROSSIER, O., OCTEAU, V., SIBARITA, J.-B., LEDUC, C., TESSIER, B., NAIR, D., GATTERDAM, V., DESTAING, O., ALBIGÈS-RIZO, C., TAMPÉ, R., COGNET, L., CHOQUET, D., LOUNIS, B., AND GIANNONE, G. Integrins $\beta 1$ and $\beta 3$ exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nat. Cell Biol.* 14, 10 (Oct. 2012), 1057–67.
- [117] SAKAI, T., JOVE, R., FÄSSLER, R., AND MOSHER, D. F. Role of the cytoplasmic tyrosines of beta 1A integrins in transformation by v-src. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7 (2001), 3808–3813.
- [118] SAWADA, Y., TAMADA, M., DUBIN-THALER, B. J., CHERNIAVSKAYA, O., SAKAI, R., TANAKA, S., AND SHEETZ, M. P. Force Sensing by Mechanical Extension of the Src Family Kinase Substrate p130Cas. *Cell* 127, 5 (2006), 1015–1026.
- [119] SAXTON, M. J., AND JACOBSON, K. Single-particle tracking : applications to membrane dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26 (1997), 373–399.
- [120] SCHALLER, M. D. Paxillin : a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncology* (2001).

- [121] SCHILLER, H. B., HERMANN, M.-R., POLLEUX, J., VIGNAUD, T., ZANIVAN, S., FRIEDEL, C. C., SUN, Z., RADUCANU, A., GOTTSCHALK, K.-E., THÉRY, M., MANN, M., AND FÄSSLER, R. β 1- and α v-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments. *Nat. Cell Biol.* 15, 6 (2013), 625–36.
- [122] SCHWILLE, P., KORLACH, J., AND WEBB, W. W. Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes. *Cytometry* 36, 3 (1999), 176–182.
- [123] SEONG, J., WANG, N., AND WANG, Y. Mechanotransduction at focal adhesions : from physiology to cancer development. *J. Cell. Mol. Med.* 17, 5 (May 2013), 597–604.
- [124] SHATTIL, S. J., KIM, C., AND GINSBERG, M. H. The final steps of integrin activation : the end game. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 4 (Apr. 2010), 288–300.
- [125] SHROFF, H., GALBRAITH, C. G., GALBRAITH, J. A., AND BETZIG, E. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nat. Methods* 5, 5 (2008), 417–423.
- [126] SOTTILE, J., AND HOCKING, D. C. Fibronectin Polymerization Regulates the Composition and Stability of Extracellular Matrix Fibrils and Cell-Matrix Adhesions. *Mol. Biol. Cell* 13, October (2002), 3546–3559.
- [127] SRIVASTAVA, M., AND PETERSEN, N. O. Image cross-correlation spectroscopy : A new experimental biophysical approach to measurement of slow diffusion of fluorescent molecules. *Methods Cell Sci.* 18, March (1996), 47–54.
- [128] STASEVICH, T. J., MUELLER, F., MICHELMAN-RIBEIRO, A., ROSALES, T., KNUTSON, J. R., AND MCNALLY, J. G. Cross-validating FRAP and FCS to quantify the impact of photobleaching on in vivo binding estimates. *Biophys. J.* 99, 9 (2010), 3093–3101.
- [129] THÉRY, M., PÉPIN, A., DRESSAIRE, E., CHEN, Y., AND BORNENS, M. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63, 6 (June 2006), 341–55.
- [130] TIKHMYANOVA, N., LITTLE, J., AND GOLEMIS, E. A. CAS proteins in normal and pathological cell growth control. *Cell. Mol. Life. Sci.* 6, 67 (2010), 1025–1048.
- [131] TRAPPMANN, B., GAUTROT, J. E., CONNELLY, J. T., STRANGE, D. G. T., LI, Y., OYEN, M. L., COHEN STUART, M. A., BOEHM,

- H., LI, B., VOGEL, V., SPATZ, J. P., WATT, F. M., AND HUCK, W. T. S. Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nat. Mater.* 11, 7 (July 2012), 642–9.
- [132] TRICHET, L., LE DIGABEL, J., HAWKINS, R. J., VEDULA, S. R. K., GUPTA, M., RIBRAULT, C., HERSEN, P., VOITURIEZ, R., AND LADOUX, B. Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 18 (May 2012), 6933–8.
- [133] TUCKER, C. L., VRANA, J. D., AND KENNEDY, M. J. Tools for Controlling Protein Interactions Using Light. *Curr. Protoc. cell Biol.*, January (2014).
- [134] TURNER, C. E., GLENNEY, J. R., AND BURRIDGE, K. Paxillin : A new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J. Cell Biol.* 111, 3 (1990), 1059–1068.
- [135] VIGNAUD, T., GALLAND, R., TSENG, Q., BLANCHON, L., COLOMBELLI, J., AND THÉRY, M. Reprogramming cell shape with laser nano-patterning. *J. Cell Sci.* 125, Pt 9 (May 2012), 2134–40.
- [136] VON WICHERT, G., JIANG, G., KOSTIC, A., DE VOS, K., SAP, J., AND SHEETZ, M. P. RPTP- α acts as a transducer of mechanical force on $\alpha v/\beta 3$ -integrin-cytoskeleton linkages. *J. Cell Biol.* 161, 1 (2003), 143–153.
- [137] WANG, N., BUTLER, J. P., AND INGBER, D. E. Mechanotransduction across the cell surface and through the. *Science* (80-.). (1993).
- [138] WANG, N., TYTELL, J. D., AND INGBER, D. E. Mechanotransduction at a distance : mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat. Rev.* 10, JANuARy (2009), 75–82.
- [139] WEBB, D. J., DONAIS, K., WHITMORE, L. A., THOMAS, S. M., TURNER, C. E., PARSONS, J. T., AND HORWITZ, A. F. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.* 6, 2 (Feb. 2004), 154–61.
- [140] WEHRLE-HALLER, B., AND IMHOF, B. A. The inner lives of focal adhesions. *Trends Cell Biol.* 12, 8 (2002), 382–389.
- [141] WEN, J. H., VINCENT, L. G., FUHRMANN, A., CHOI, Y. S., HRIBAR, K., TAYLOR-WEINER, H., CHEN, S., AND ENGLER, A. J. Interplay of Matrix Stiffness and Protein Tethering in Stem Cell Differentiation. *Nat. Mater.* 13, 10 (2014), 979–987.
- [142] WISEMAN, P. W., BROWN, C. M., WEBB, D. J., HEBERT, B., JOHNSON, N. L., SQUIER, J. A., ELLISMAN, M. H., AND HORWITZ,

- A. F. Spatial mapping of integrin interactions and dynamics during cell migration by image correlation microscopy. *J. Cell Sci.* 117, Pt 23 (Nov. 2004), 5521–34.
- [143] WISEMAN, P. W., AND WILSON, K. R. Two-photon image correlation spectroscopy and image cross-correlation spectroscopy. *J. Microsc.* 200, February (2000), 14–25.
- [144] WOLFENSON, H., BERSHADSKY, A., HENIS, Y. I., AND GEIGER, B. Actomyosin-generated tension controls the molecular kinetics of focal adhesions. *J. Cell Sci.* 124, Pt 9 (2011), 1425–1432.
- [145] YEDNOCK, T., CANNON, C., VANDEVERT, C., GOLDBACH, E. G., SHAW, G., ELLIS, D. K., LIAW, C., FRITZ, L., AND TANNER, L. $\alpha 4 \beta 1$ Integrin-dependent cell adhesion is regulated by a low affinity receptor pool that is conformationally responsive to ligand. *The Journal of Biological Chemistry* 270, SUPPL. 1 (1995), 28740–28750.
- [146] ZAIDEL-BAR, R. Job-splitting among integrins. *Nat. Cell Biol.* 15, 6 (June 2013), 575–7.
- [147] ZAMIR, E., AND GEIGER, B. Components of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 114 (2001), 3577–3579.
- [148] ZAMIR, E., KATZ, B. Z., AOTA, S., YAMADA, K. M., GEIGER, B., AND KAM, Z. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 1 (1999), 1655–1669.
- [149] ZHANG, X., JIANG, G., CAI, Y., MONKLEY, S. J., CRITCHLEY, D. R., AND SHEETZ, M. P. Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat. Cell Biol.* 10, 9 (2008), 1062–1068.

Thermosensitive
Micropatterned Substrates[☆]

9

Lionel Bureau, and Martial Balland

Laboratoire Interdisciplinaire de Physique UMR 5588, Univ. Grenoble 1/CNRS, Grenoble, France

CHAPTER OUTLINE

Introduction	146
9.1 Materials.....	146
9.1.1 Reagents	146
9.1.1.1 Grafting of Polymer Brushes	146
9.1.1.2 Surface Coating after Brush Growth	146
9.1.2 Equipment.....	147
9.2 Procedure and Timeline	147
9.2.1 Surface Functionalization with ATRP Initiator	147
9.2.2 Deep UV Patterning of the Initiator Layer.....	148
9.2.3 PNIPAM Brush Growth.....	149
9.2.4 Surface Functionalization.....	149
9.2.5 Plating of the Cells	150
9.2.6 Time Line	150
9.3 Expected Results	150
9.3.1 Patterned PNIPAM Brushes.....	150
9.3.2 Cell Geometrical Confinement	152
9.3.3 Cell Detachment.....	152
9.4 Troubleshooting	153
9.5 Discussion.....	154
References	154

Abstract

We describe the design of micropatterned surfaces for single cell studies, based on photo-patterned thermoresponsive polymer brushes. Such surfaces allow for spatially controlled cell adhesion at 37 °C and thermal harvesting of the studied cells at T < 32 °C.

[☆]*Competing financial interests:* The authors declare no competing financial interests.

INTRODUCTION

Spatial control of adhesion between living cells and synthetic substrates is a major key to many biotechnological and biomedical applications [Falconnet, D., Csucs, G., Grandin, H. M., & Textor, M. \(2006\)](#); [Thery, M. \(2010\)](#). In this way cell patterning methods are powerful tools to perform reliable statistical analysis of cellular response to environmental cues or to design model tissues of well-defined architectures that mimic cell arrangement *in vivo*.

In the field of micropatterning, the design of advanced “smart” substrates for cell culture, which adhesive properties can be dynamically altered on-demand, is emerging as a highly promising way to increase our understanding of dynamic cell/surface interactions [Robertus, J., Browne, W. R., & Feringa, B. L. \(2010\)](#). We herein describe a protocol to design micropatterned surfaces for cell biology based on the use of thermoresponsive polymer brushes made of poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) [Nagase, K., Kobayashi, J., & Okano, T. \(2009\)](#). Grafted at high surface density, PNIPAM displays excellent protein and cell antiadhesive properties. Furthermore, a proper choice of the adhesive pattern shapes, combined with the temperature-dependent swelling properties of PNIPAM, allows to use the polymer brush as a microactuator which induces cell detachment without using any chemical reagent [Mandal, K., Balland, M., & Bureau, L. \(2011\)](#).

9.1 MATERIALS

9.1.1 Reagents

9.1.1.1 Grafting of polymer brushes

Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) brushes are grafted from standard #1 glass coverslips. Chain growth is performed by surface-initiated atom transfer radical polymerization (ATRP), according to a protocol similar to that described in detail in [Mandal, Balland, and Bureau \(2011\)](#), which requires the following reagents.

3-Aminopropyl-triethoxysilane (APTES), triethylamine (TEA), copper chloride (CuCl), 1,1,7,7-pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA), 2-bromo-2-methylpropionyl bromide (BMPB), dichloromethane (DCM, Rectapur VWR), and sodium hydroxide pellets are used as received.

N-Isopropylacrylamide (NIPAM, 99%, ACROS Organics) is purified twice by recrystallization in *n*-hexane in order to remove the polymerization inhibitor present in the delivered bulk monomer.

All aqueous solutions are prepared in ultrapure water.

9.1.1.2 Surface coating after brush growth

Fibronectin from bovine plasma (Sigma), aliquoted in 25 μ L aliquots stored at -20°C . Once diluted, it is stored at $+4^{\circ}\text{C}$.

Alexa 546 conjugated fibrinogen (Invitrogen), aliquoted in 25 μL aliquots stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Once diluted, it is stored at $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

9.1.2 Equipment

BRUSH GROWTH

- All reactions must be carried out in a hood adapted for organic solvent vapors.
- Standard lab and glassware are needed: beakers, petri dishes, round-bottom flasks, rubber septa, plastic syringes, $0.2\text{ }\mu\text{m}$ syringe filters, magnetic stirrer, argon or nitrogen gas.

PATTERNING

- UV ozone oven 185 nm (important: wavelength has to be less than 200 nm) under a hood or equipped with ozone catalyzer (UVO cleaner, model 342-220, Jelight).
- In our hands, UV irradiation of the surfaces through the photomask was done in a custom-built device housing a set of four low-pressure mercury lamps (Heraeus Noblelight GmbH, NIQ 60/35 XL longlife lamp, $\lambda \sim 185$ and 254 nm , quartz tube, 60 W).
- Synthetic Quartz mask with features (Delta Mask, Toppan, Selba Tech).

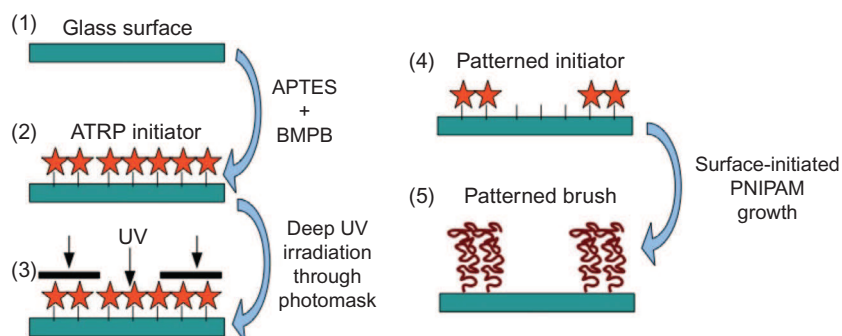
9.2 PROCEDURE AND TIMELINE

9.2.1 Surface functionalization with ATRP initiator

(Wear nitrile gloves throughout the following steps)

The volumes of solution given below are typical for the preparation in parallel of four coverslips of 20 mm in diameter. They should be adapted if more or less samples are to be elaborated in one batch.

1. Prepare an aqueous solution of APTES (100 μL of APTES in 50 mL of water, i.e., $8.5 \times 10^{-3}\text{ M}$), stir it at room temperature in the lab atmosphere for 2 h, and subsequently pass the solution through a syringe filter of pore size $0.2\text{ }\mu\text{m}$. This first step is required in order to hydrolyze the APTES ethoxy groups before covalent grafting onto the glass surfaces.
2. Clean the substrates in a 1 M sodium hydroxide aqueous solution (40 g NaOH in 1 L of water) for 15 min and rinse thoroughly with water.
3. Immerse the substrates for 1 min in the aqueous solution of APTES prepared in step 1, then rinse with water and dry in a nitrogen stream.
4. Immerse the samples for 1 min in a solution of DCM (25 mL) containing TEA (1.2 mL) and BMPB (250 μL). Rinse successively with DCM, ethanol, and water and dry with nitrogen.

**FIGURE 9.1**

Sketch of the various steps leading to patterned PNIPAM brushes grafted onto glass surfaces.

This fourth step leads to surface immobilization, on the amino-terminated sites, of the brominated ATRP initiator (see Fig. 9.1 (1) and (2)). At the end of this step, the surface of the substrates should be hydrophobic, and quick dewetting of water during rinsing is observed in case of successful functionalization of the samples with the ATRP initiator layer.

9.2.2 Deep UV patterning of the initiator layer

1. Thoroughly clean the quartz/chromium mask with isopropanol (use a soft tissue for cleaning to avoid scratching the mask). Repeat washing steps if necessary.
2. Cover the mask surface with isopropanol and blow it from the surface using clean nitrogen to prevent traces of solvent on the mask surface.
3. Put 1 μL of hexadecane (for 20 mm coverslip) on the metal side of the mask.
4. Place the initiator-functionalized coverslip on the mask, with the functionalized side in contact with the hexadecane drop. Press manually on the coverslip in order to expel the excess of hexadecane and ensure a good coverslip/mask contact.
5. Put the quartz mask with its quartz side facing the lamp (the coverslip on the lower side holds in place by capillarity).
6. Illuminate 2–3 min. Minimal illumination time can vary for different deep UV equipment. The time reported here corresponds to the homemade vessel described earlier, placing the mask at a distance of 3 cm from the lamps.
7. After illumination, carefully peel off the coverslip from the mask. Add ethanol to facilitate coverslip detachment at this step. Rinse with ethanol and water and dry in a nitrogen flow.

At the end of this process, the regions of the coverslips that have been irradiated with deep UV through the transparent parts of the photomask are devoid of the active polymerization initiator, which has been removed or degraded by UV light.

Surface-initiated polymerization will then be restricted to the regions of the glass sample that have not been irradiated at this step (see Fig. 9.1 (3), (4) and (5)).

9.2.3 PNIPAM brush growth

1. In a round bottom flask, prepare a solution of NIPAM (0.6 g), PMDETA (150 μ L), and water (20 mL). Seal the flask with a rubber septum and de-oxygenate the solution for 30 min by bubbling argon or nitrogen gas through a cannula or a stainless steel needle immersed in the solution.
2. In parallel, place 15 mg of CuCl powder and a magnetic bar inside a second round bottom flask. Seal the flask with a septum and purge it with argon or nitrogen for 30 min.
3. Transfer the NIPAM solution to the flask containing CuCl. Use a plastic syringe with a stainless steel needle to pump the solution through the sealing septum and transfer it to the second flask. Keep the argon or nitrogen flow inside the flasks during the transfer. Stir the NIPAM solution and CuCl for 1 min using a magnetic stirrer. Upon CuCl dissolution in water, the solution is yellow during the first seconds and subsequently turns to greenish.
4. Place the coverslips bearing the patterned initiator layer in a Petri dish, with their functionalized side up.
5. Pump the NIPAM solution containing the copper catalyst with a syringe and transfer it to the Petri dish containing the coverslips. Surface-initiated polymerization of the PNIPAM chains starts at that point. Let the polymerization proceed for 2–5 min in the lab atmosphere at room temperature. During this step, the NIPAM solution slowly turns to blue as oxygen diffuses into it and copper switches from oxidation state I to oxidation state II.
6. Stop the polymerization reaction by overflowing the samples with pure water.
7. Rinse the coverslips with water and dry with nitrogen. After brush growth, the substrate surfaces should be hydrophilic at room temperature in case of successful grafting of PNIPAM.

9.2.4 Surface functionalization

1. Clean PNIPAM-treated glass coverslips with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4.
2. Put 100 μ L drop (this volume was used for a 20 \times 20 mm glass coverslip and must be adapted to the coverslip size) of protein solution composed of 20 μ g/mL fibronectin/5 μ g/mL fibrinogen-Alexa fluor 546 nm (to visualize the pattern) in 10 mM Hepes (pH 8.5) on a flat piece of parafilm.
3. Place patterned substrates directly on top of the protein solution.
4. Incubate for 1 h at room temperature, protected from external light.
5. Wash patterned surface twice in PBS bath.

9.2.5 Plating of the cells

1. Collect cells using trypsin or trypsin–Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).
2. Rinse EDTA solution with prewarmed culture medium.
3. Resuspend cells using a 1 mL micropipette to separate them well.
4. Add 50,000–100,000 cells for a 20 mm coverslip (this might depend on your pattern density). Use a small volume (e.g., 500 μ L for a 20 \times 20 mm coverslip).
5. Mix gently to evenly distribute the cells and place the coverslip inside the incubator at 37 °C without moving it.
6. Wash unattached cells 30 min (depending on the cell type) after plating with equilibrated prewarmed culture medium. After 1 h most of the cells should be spread.

9.2.6 Time line

1. Polymer grafting: grafting of the initiator layer on the coverslips requires approximately 2 h 30 min, most of which is dedicated to the hydrolysis of the APTES molecules. Deep UV patterning of the layer takes 15–30 min, and the final PNIPAM brush growth requires 45 min, including 30 min of solution degassing. Overall, not more than 4 h are needed to produce several (typically between 4 and 10) coverslips that can then be stored dried for several months before use.
2. Incubation of protein and washing: 1 h.
3. Plating the cells: 30 min.

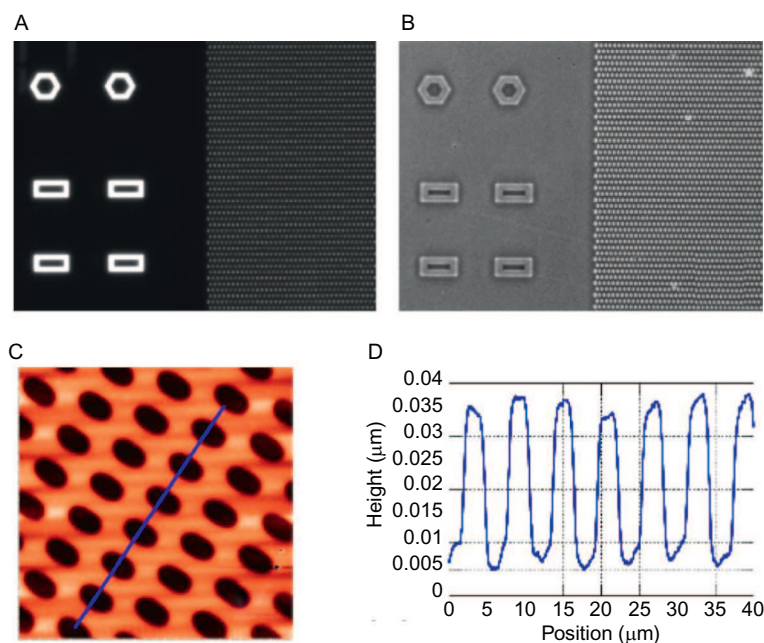
Total time: 5.5 h

9.3 EXPECTED RESULTS

9.3.1 Patterned PNIPAM brushes

Using an APTES concentration of 8.5×10^{-3} M and a NIPAM polymerization time of 2–5 min as reported above should yield PNIPAM brushes of dry thickness ranging from 30 to 90 nm, which roughly corresponds to their thickness when immersed in aqueous medium at 37 °C. Details on the effect of these two parameters on the final brush thickness can be found in [Mandal et al. \(2011\)](#). If needed, the dry thickness of the elaborated brushes can be quantitatively determined by ellipsometry measurements on brushes grown, in the same batch as the coverslips, on silicon wafers bearing a native oxide layer, using the exact same chemistry protocol.

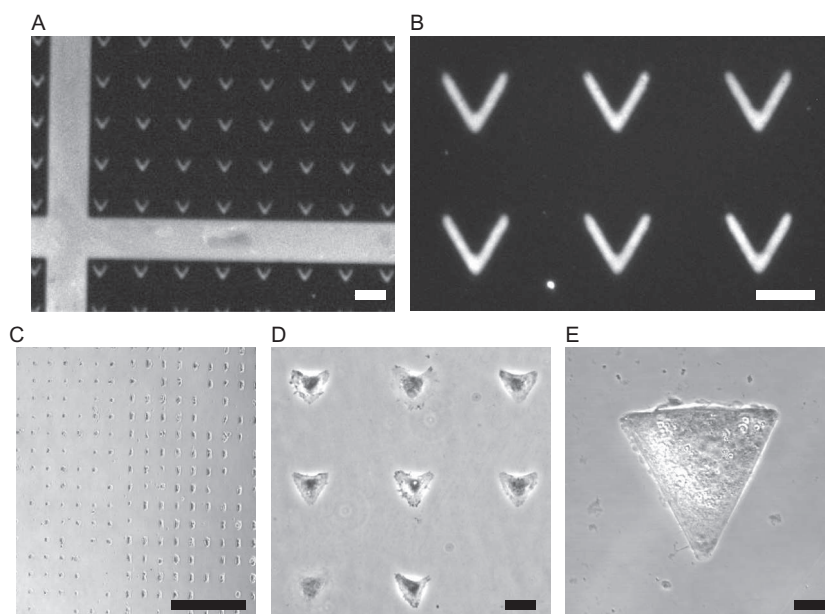
The conditions for brush growth reported here ensure in any case that the PNIPAM layers obtained display superior antiadhesive properties, and that protein adsorption and cell adhesion will be restricted to the regions on the coverslips where the polymerization initiator has been removed during UV irradiation.

**FIGURE 9.2**

(A) Bright field image of patterns on photomask (image size $486 \times 365 \mu\text{m}$). (B) Phase contrast image of corresponding patterns on a coverslip (image size $486 \times 365 \mu\text{m}$). The oval features on the right part of the image have dimensions of $2 \times 4 \mu\text{m}$ on the mask and appear as ovals of $3.5 \times 6 \mu\text{m}$ on the coverslip. (C) AFM topography scan ($50 \times 50 \mu\text{m}$) in a region of a coverslip exhibiting oval patterns. (D) Height profile measured along the blue line drawn on image (C): height of features is 30–32 nm, consistent with the ellipsometric thickness of 35 nm measured for this sample.

Without any further functionalization or labeling, the shape and sharpness of the adhesive patterns can be readily assessed before plating cells on the substrates. Indeed, the differences in thickness and refractive index between the bare and polymer-covered regions are such that patterns are visible in phase contrast microscopy. An example of such images is shown in Fig. 9.2. Comparison between initial pattern sizes on the quartz/chromium mask and the geometrical features produced on the coverslips show that the obtained patterns are typically 1–2 μm broader than the original ones.

The efficiency of the deep UV deactivation of the polymerization initiator can be evaluated by comparing the height of the geometrical features measured, for example, by atomic force microscopy (AFM) topography on a dry patterned brush, which must be consistent with the brush dry thickness measured by ellipsometry on a silicon wafer. An example of AFM topography image is shown in Fig. 9.2.

**FIGURE 9.3**

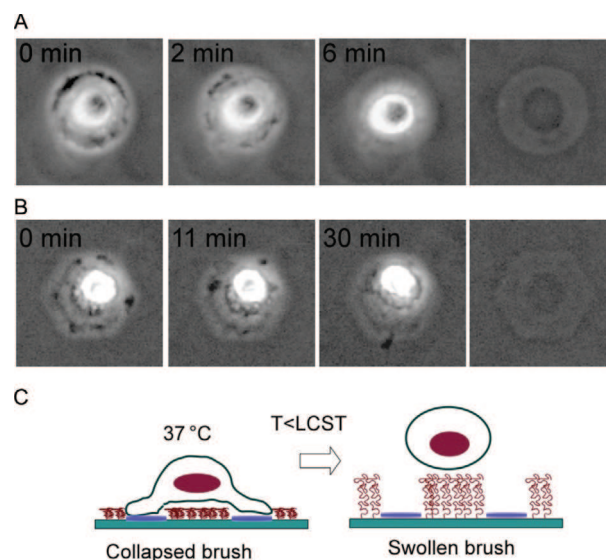
(A) Protein adsorption on V-shaped micropatterns (scale bar 80 μm). (B) Zoom in on the image of corresponding patterns, usually signal-to-noise ratio is in the range of 10 (scale bar 30 μm). (C) Large field phase contrast image of cells adhered on round (left) and rectangular-shaped (right) micropatterns (scale bar 500 μm). (D)/(E) Phase contrast images at two different magnification of cells plated, respectively, on V and triangular-shaped micropatterns (scale bars are respectively 30 and 7 μm).

9.3.2 Cell geometrical confinement

A good result is about 60% of patterns with a single cell. Cells should follow the pattern envelope without spreading out of the patterned region. Cells can be maintained in geometric confinement for few days, during which cell division occurred, indicating good biocompatibility of the patterned surfaces (Fig. 9.3).

9.3.3 Cell detachment

It is possible to take advantage of PNIPAM polymer thermoresponsiveness to generate forces directly onto the cells and thus induce gentle cell detachment. To do that a proper choice of the pattern shapes has to be performed. The pattern has to be such that cells spread over a nonadhesive PNIPAM region. While bridging two adhesion zones, the cell body cross over a PNIPAM surface which swelling, induced by temperature lowering, triggers the generation of forces that are sufficient (depending on the ratio between adhesive and nonadhesive region surfaces, usually this ratio has to be in the range of 20–30%) to detach single cells (Fig. 9.4).

**FIGURE 9.4**

(A and B) Sequences of cells detaching as temperature is lowered from 37 °C to room temperature (the time stamp gives the time elapsed since the surfaces were taken out of the incubator). (C) Sketch of the polymer chains swelling inducing cell detachment.

9.4 TROUBLESHOOTING

Patterns are not visible by phase-contrast microscopy:

- The contact between the coverslip and the photomask was not good and the mask/sample distance was too large, resulting in the initiator being ablated outside of the transparent region of the mask (take care to avoid dust particles, adapt the volume of the hexadecane drop to the surface of the coverslip so as to ensure an intimate contact with the mask)
- Irradiation time was too short to induce efficient ablation of the initiator
- Polymerization did not occur (check the coverslip hydrophilicity)

Cells do not adhere on the surface: the deep UV patterning step has not ablated all the initiator molecules and polymer chains have grown over the patterned region (increase the irradiation time in order to fully remove initiator).

Cells are spreading outside of the pattern: this is a classical problem with micro-patterning. The main reason for this problem is related to PNIPAM being grafted at a too low density: increase the initial APTES concentration to obtain a denser layer of polymerization initiator.

Cells are not spreading over the entire pattern envelope: this problem might have multiple origins: increase fibronectin concentration/change the protein used

for surface functionalization/adjust cell incubation time/adjust the pattern size to your specific cell type by measuring it statistically on an homogenous coated surface (typical cell surface are in the range of few hundreds to few thousands micrometer square).

No cells are detaching from the surface: the length of the polymer chains is too small and brush swelling does not allow to apply sufficiently large forces to induce cell detachment. Increase the PNIPAM brush length by adjusting the NIPAM concentration and/or the polymerization time.

9.5 DISCUSSION

The described protocol represents a reliable, fast, and cost-effective technique to design thermosensitive micropatterned platforms. Compared to the existing well-established templating techniques, the method we report presents the following important features:

- i. PNIPAM brushes are elaborated from inexpensive chemicals and require only common chemistry facilities. Furthermore, micron-scale patterning is achieved in one single step, without requiring access to clean room facilities.
- ii. Polymer chains being covalently bound to the substrate, such coatings show excellent usage and storage long-term stability, can be reused for several experiments after being rinsed with common organic solvents (ethanol, isopropanol, etc.).
- iii. High grafting density brushes display superior protein and cell repellency, obtained in an extremely reliable and reproducible way.
- iv. The temperature-controlled conformation change of PNIPAM, combined with a proper choice of the pattern shapes, makes the polymer coating act as a thermoactuator which allows us to detach the studied cells by lowering the surface temperature. This adds a very attractive feature to the usual “passive” micropatterned platforms.

References

- Falconnet, D., Csucs, G., Grandin, H. M., & Textor, M. (2006). Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials*, 27, 3044.
- Mandal, K., Balland, M., & Bureau, L. (2011). Thermoresponsive micropatterned substrates for single cell studies. *PLoS One*, 7, e37548.
- Nagase, K., Kobayashi, J., & Okano, T. (2009). Temperature-responsive intelligent interfaces for biomolecular separation and cell-sheet engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, 6, S293.
- Robertus, J., Browne, W. R., & Feringa, B. L. (2010). Dynamic control over cell adhesive properties using molecular-based surface engineering strategies. *Chemical Society Reviews*, 39, 654.
- Thery, M. (2010). Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *Journal of Cell Science*, 123, 4201.

Micropatterning on gel (Waxing protocole)

Glass silanization:

1. Prepare an aqueous solution of APTES (100 μL of APTES in 50 mL of water, i.e. 8.5×10^{-3} M), stir it at room temperature in the lab atmosphere for 2 hours, and subsequently pass the solution through a syringe filter of pore size 0.2 μm . This first step is required in order to hydrolyze the APTES ethoxy groups before covalent grafting onto the glass surfaces.
2. Clean the master with Deep UV for 10' to get rid of all the organic molecules stuck on its surface and in UV-Atmosphere-Plasma Cleaner for 6' (switch it on for 3' before to clean it).
3. Immerse the substrates for 10 minute in the aqueous solution of APTES prepared in step 1, then rinse with water and dry in a nitrogen stream.
4. Immerse the samples for 10 minute in a solution of dichloromethane (25 mL) containing TEA (1.2 mL) and BMPB (250 μL). Rinse successively with dichloromethane, ethanol and water, and dry with nitrogen.

This fourth step leads to surface immobilization, on the amino-terminated sites, of the brominated ATRP initiator. At the end of this step, the surface of the substrates should be hydrophobic, and quick dewetting of water during rinsing is observed in case of successful functionalization of the samples with the ATRP initiator layer.

Deep-UV patterning of the initiator layer:

1. Thoroughly clean the quartz/chromium mask with isopropanol (use a soft tissue for cleaning to avoid scratching the mask). Repeat washing steps if necessary.
2. Cover the mask surface with isopropanol and blow it from the surface using clean nitrogen to prevent traces of solvent on the mask surface
3. Put 8 μL of hexadecane (for 50 mm master) on the metal side of the mask, 4 μL is enough if put in the middle of a square of patterns.
4. Place the initiator-functionalized coverslip on the mask, with the functionalized side in contact with the hexadecane drop. Press manually on the coverslip in order to expel the excess of hexadecane and ensure a good coverslip/mask contact. The master must not slide on the mask but has to be stuck on it.
5. Put the quartz mask with its quartz side facing the lamp (the coverslip on the lower side holds in place by capillarity).
6. Illuminate 2 min. Minimal illumination time can vary for different deep-UV equipment. The time reported here corresponds to the homemade vessel described above, placing the mask at a distance of 3 cm from the lamps.
7. After illumination, carefully peel off the coverslip from the mask. Add ethanol to facilitate coverslip detachment at this step. Rinse with ethanol and water, and dry in a nitrogen flow.

At the end of this process, the regions of the coverslips that have been irradiated with deep-UV through the transparent parts of the photomask are devoid of the active polymerization initiator, which has been removed or degraded by UV light. Surface-initiated polymerization will then be restricted to the regions of the glass sample that have not been irradiated at this step.

PNIPAM brush growth:

1. In a round bottom flask, prepare a solution of NIPAM (0.6 g), PMDETA (150 μL) and water (20 mL). Seal the flask with a rubber septum and de-oxygenate the solution for 30 minutes by bubbling argon or nitrogen gas through a cannula or a stainless steel needle immersed in the solution.
2. In parallel, place 15 mg of CuCl powder and a magnetic bar inside a second round bottom flask. Seal the flask with a septum and purge it with argon or nitrogen for 30 minutes.
3. Transfer the NIPAM solution to the flask containing CuCl. Use a plastic syringe with a stainless steel needle to pump the solution through the sealing septum and transfer it to the second flask. Keep the argon or nitrogen flow inside the flasks during the

transfer. Stir the NIPAM solution and CuCl for 1 minute using a magnetic stirrer. Upon CuCl dissolution in water, the solution is yellow during the first seconds and subsequently turns to greenish.

4. Place the coverslips bearing the patterned initiator layer in a Petri dish, with their functionalized side up.

5. Pump the NIPAM solution containing the copper catalyst with a syringe and transfer it to the Petri dish containing the coverslips. Surface-initiated polymerization of the PNIPAM chains starts at that point. Let the polymerization proceed for 5 minutes in the lab atmosphere at room temperature. **If the PNIPAM is old (forming clusters, not a thin powder), do not hesitate to let it polymerize for 10'.**

During this step, the NIPAM solution slowly turns to blue as oxygen diffuses into it and copper switches from oxidation state I to oxidation state II.

6. Stop the polymerization reaction by overflowing the samples with pure water.

7. Rinse the coverslips with water and dry with nitrogen. After brush growth, the substrate surfaces should be hydrophilic at room temperature in case of successful grafting of PNIPAM.

Gel preparation:

1. Put a drop of 50µl of fibronectin 100µg/ml between the master and a coverslip 32mm 100% NIPAM to cover a good surface of the master. 2. After 45', remove the coverslip slowly, and slide outside of the region where the proteins are to remove the excess.

3. **Quickly** put a drop of 50 µl of the mix APS/TEMED/Acryl/BisAcryl/Beads solution **(the protein layer must not dry)**, following other protocol (167 µl Bis/acrylamide, 1 µl TEMED, 1 µl APS).

4. Put on the drop a silanized coverslip with a high affinity for acrylamid following previous protocol, and let it polymerize for 1hour,

5. Immerge with water for **5 minutes** and detach carefully. Store your gel face up on a petri dish with PBS.

6. Wash the master with mQ-water and Isopropanol without scratching the surface.

7. Blow on it with nitrogen, and let it dry at RT.

Prémix polyacrylamide :

Acrylamide stock 40% (ml)	Bisacrylamide stock 2% (ml)	DPBS (ml)	E (kPa)
1.25	0.75	8	4.47
2.5	0.5	7	10.61
2.5	0.75	6.75	16.7
2.5	1.5	6	34.88
2	2.4	5.6	40.40

Préparation gel patterné avec billes (Deep-UV protocole) :

1. 167µl de prémix
2. Ajoutez 1µl de billes PLL-PEG, soniquez pendant 5min. (sortir APS du frigo)
3. Nettoyage du masque (Portez des gants !) H₂O, isopropanol et n-hexane (dangereux).
4. Ajoutez 1µl TEMED et 1µl APS à 2.
5. Vortexer 10sec.
6. Mettre une goutte sur le masque (30µl pour lamelle carré 20x20 mm ; 50µl pour lamelle ronde 32mm).
7. Mettre un papier humidifié à proximité et protéger de la lumière.
8. Laissez polymériser pdt 1h.
9. Photoactivé la surface aux UV. (4min pour gel homogène, 5min pour gel patterné).
10. Décongelé EDC/NHS
11. Noyez le masque d'eau stérile pour réhydrater le gel et faciliter de décollement.
12. Mettre un film de parafilm sur la paillasse, et s'assurer que le film est plan.
13. Mélangez EDC/NHS (50µl + 50µl)
14. Déposez la goutte sur le parafilm
15. Détachez délicatement la lamelle avec un scalpel (soulevez légèrement la lamelle pour laisser s'infiltrer l'eau en 3 endroits différents pour assurer la planitude du gel.)
16. Déposez la surface du gel sur la goutte, et laissez à RT pdt 25min à l'abri de la lumière et en prenant soin de soulever la lamelle pour ôter les bulles (5' 15' 25').
17. Préparer à proximité de la flamme d'un bec bunsen la solution pour fonctionnaliser la surface. Mélanger 97µl d'HEPES stérile pH8.5 10mM avec 2µl de Fibronectine (non fluorescent) et 1µl de fibronectine fluorescent (Bien vortexer les solutions de fibro avec pipetage pour homogénéiser la solution).
18. Vortexer 17, et mettre la goutte sur le parafilm.
19. Enlevez l'excès de EDC/NHS et déposez la surface du gel sur la goutte de fibro.
20. Laissez agir pdt 1h.
21. Nettoyez la lamelle 2-3fois au PBS, et stocker à 4°C dans du PBS (3-4jours max).

Congélation cellulaire :

1. Concentrez les cellules dans un eppendorf (1volume)
2. Préparer un milieu de congélation (50% milieu complet, 30% SVF, 20% DMSO) (1volume)
3. Mixer 1 et 2
4. Faire des aliquots dans des tubes avec joint thorique
5. Mettre à -80°.

PFA 4 % dans Tampon Phosphate 0.1M pH 7.3 :

Pour 500ml de PFA 4 % :

20g de PFA de 250ml d'H₂O
Agiter à 60°C
Ajouter 1ml NaOH à 0.1M
Attendre la dissolution sous la hotte ~30min
Melanger à 250ml de tampon Phosphate à 0.2M pH 7.3
Conserver à 4°C.

Tampon Phosphate 0.2M pH 7.3

21.8g de Na₂HPO₄
7.4g NaH₂PO₄
QSP 1l H₂O
HPO₄⁻ pour ajuster le pH.

Table des figures

1.1	Rigidité tissulaire	5
1.2	Effet de la rigidité sur la migration cellulaire	7
1.3	Migration de REF52 sur des micropiliers de PDMS	8
1.4	Effet de la concentration en matrice extra-cellulaire sur la cellule	9
1.5	Effet d'anticorps sur la cicatrisation	11
1.6	Effet des propriétés mécaniques sur l'expression génique	12
1.7	Type de différenciation observé en fonction de la rigidité du substrat	12
1.8	Contraction d'une fibre d'actine par la myosine	15
1.9	Branchage de l'actine à 70 ° grâce au complexe Arp2/3	16
1.10	Les super-structures de l'actine une fois la cellule adhérente au substrat	18
1.11	Les récepteurs membranaires transmettant les forces	20
1.12	Famille des intégrines et leurs ligands extra-cellulaires	22
1.13	Étalement de cellule MEF sur verre.	23
1.14	Fonction des intégrines au cours du développement embryon- naire de la souris	24
1.15	Cycle d'activation/inhibition des intégrines	26
1.16	Les différentes voies d'activation des intégrines	27
1.17	Les différents partenaires des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$	28
1.18	Les protéines mécanosensibles	29
1.19	Le cycle d'activation des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$	30
1.20	Maturation d'un complexe focal en adhérence focal	32
1.21	Composition protéique d'un complexe focal	33
1.22	Composition protéique d'une adhérence focale	34
1.23	Photoblanchiment d'une plaque focale	35
1.24	La coopération entre $\beta 1$ et $\beta 3$	38
1.25	Base moléculaire de la mécanotransduction	39
1.26	Principe de la fluorescence	41
1.27	Principe du microscope confocal	43
1.28	Exemple d'une expérience de FRAP	44

1.29	Déconvolution de la PSF par PALM pour la SPT	47
1.30	Dynamique de $\beta 3$ par SPT	48
1.31	Principe de la FCS	49
1.32	Figure résumé des techniques d'ICS	51
1.33	Principe du tICS	52
1.34	Exemple de segmentation pour l'analyse de tICS	53
1.35	Exemple d'application du STICS	54
1.36	Principe du RICS	56
3.1	Les différentes étapes du greffage de NIPAM sur verre	63
3.2	Contrôle de l'adhérence cellulaire sur verre	64
3.3	Protocole de création d'un gel mou patterné par épilation	65
3.4	Segmentation des différentes régions en fonction des niveaux de tensions	71
3.5	Paramètre de tri des données de TICS	72
3.6	Définition d'une zone d'analyse en RICS	73
3.7	Distribution des adhérences	79
3.8	Tri cellulaire	82
4.1	Surface moyenne des MEF	86
4.2	Taille de la brosse en fonction du temps de réaction	87
4.3	Choix de la forme pour le contrôle des forces	88
4.4	Résultats TFM sur motif en flèche	91
4.5	Comparaison marquage Gel/Verre	93
4.6	Résultats AFM sur les fibres d'actines supportés ou non sup- portés	94
4.7	Gamme temporel différente technique	96
4.8	Résultats en RICS pour $\beta 3$	97
4.9	Résultats de TFM sur substrat homogène pour des cellules déficientes en $\beta 1$ ou $\beta 3$	98
4.10	Résultats de TICS sur l'intégrine $\beta 1$ -GFP	99
4.11	Résultats de TICS sur l'intégrine $\beta 3$ -GFP	101
4.12	Résultats de FRAP sur l'intégrine $\beta 3$ -GFP	103
4.13	Résultats TICS sur les chimères $\beta 1/\beta 3$	106
4.14	Résultats TICS pour le mutant $\beta 3$ N304T	109
4.15	Résultats TICS pour le mutant $\beta 3$ PaxFAK	110
4.16	Résultats TICS pour les mutants $\beta 3$ NxxA	111
4.17	Résultats TICS pour les mutants $\beta 3$ NxxF	113
4.18	Résultats de TFM sur substrat homogène pour les différents mutants de $\beta 3$	114
4.19	Résultats TICS $\beta 3$ avec drogue	117

5.1	TFM temporel en présence ou absence de $\beta 3$	122
5.2	Figure bilan	124
5.3	Système optogénétique ciblé sur SFK	125

Liste des tableaux

1.1	Phénotype in vivo des souris déficientes en intégrines	25
3.1	Anticorps et marqueurs utilisés	84
4.1	Tableau des différentes mutations faites sur l'intégrine $\beta 3$. . .	108
4.2	Tableau récapitulatif des temps de résidence pour les différents phénotypes	118